

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Doktorský studijní program: Biochemie



Mgr. Božena Kubíčková

**Využití slepičích protilátek proti lektinu PAIIL pro prevenci
infekcí *Pseudomonas aeruginosa* u pacientů
s cystickou fibrosou**

**Use of chicken antibodies against PAIIL lectin for prevention
of *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients
with cystic fibrosis**

Disertační práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Mgr. Božena Kubíčková

Prohlášení spoluautorů:

Prohlašuji, že Mgr. Božena Kubíčková rozhodujícím způsobem přispěla ke vzniku všech čtyř odborných publikací, které jsou součástí této disertační práce. Sama provedla většinu experimentů a významně se podílela i na jejich plánování, interpretaci výsledků a na sepsání publikací.

V Praze dne

.....

prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost, ale také za podporu a čas, který mi věnoval nejen během sepisování práce, ale během celého mého studia. Mé poděkování patří též mé bývalé školitelce prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za motivaci a laskavý přístup, který provázel podstatnou část mého doktorského studia. Také bych chtěla poděkovat prof. MUDr. Václavu Mandysovi, CSc. za odbornou analýzu plicní tkáně, prof. RNDr. Michaela Wimmerové, Ph.D. za poskytnutí rekombinantního lektinu PAIIL a Ing. Pavlu Trefilovi, DrSc. za provedení vakcinace slepic. Můj vděk patří i všem spolupracovníkům z laboratoře č. 221 za vytvoření příjemné atmosféry, v níž mi bylo potěšením pracovat. V neposlední řadě bych ráda poděkovala celé své rodině za podporu a pochopení, bez něhož by daná práce nevznikla.

Práce byla podporována Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (GAUK) 1584814 a Univerzitním výzkumným centrem (UNCE) 204025/2012.

Abstrakt

Cystická fibróza (CF) je jedním z poměrně běžných dědičných onemocnění, způsobené mutací genu kódujícího protein CFTR, který tvoří chloridový kanál, jež významně ovlivňuje homeostázi iontů a s ní spojené hospodaření buňky s tekutinami. Toto onemocnění postihuje zejména dýchací a trávicí soustavu, avšak z hlediska ohrožení života je nejzávažnější postižení respiračního traktu. Pacienti s CF trpí častými a opakovanými infekcemi dýchacích cest, které vedou k rozvoji chronického zánětu a postupné destrukci plicní tkáně. Tyto infekce plic vyvolané většinou oportunním patogenem *Pseudomonas aeruginosa*, který je specifický pro pacienty s CF, jsou nejčastější příčinou morbidity a mortality těchto nemocných. V současnosti jsou v terapii infekcí *Pseudomonas aeruginosa* používána antibiotika, avšak vzhledem ke vzniku rezistencí jsou hledány nové způsoby antibakteriální terapie. Vedle aktivní imunizace pacientů s CF proti *Pseudomonas aeruginosa* nabízí slibné možnosti pasivní imunizace pacientů pomocí specifických slepičích protilátek cílených proti tomuto patogenu.

Cílem předkládané disertační práce bylo proto ověřit profylaktický potenciál slepičích protilátek IgY proti virulenčnímu faktoru *Pseudomonas aeruginosa* – lektinu PAIIL a dále vyvinout experimentální zvířecí model napodobující podmínky v respiračním traktu nemocných s CF, který by byl vhodný pro studium prevence infekcí způsobených PA.

Získané výsledky potvrzují, že žloutkové IgY (v dávce 1 mg/ml po dobu působení 24 hodin) neindukují produkci testovaných prozánětlivých cytokinů u plicních epiteliálních buněk a jejich hladina je srovnatelná s fyziologickými hodnotami v lidském séru. IgY tedy nepůsobí na plicní buňky zánětlivě a lze je využít pro prevenci bakteriálních infekcí dýchacích cest. Abychom mohli testovat profylaktický potenciál protilátek IgY, vyvinuli jsme experimentální systém (adhezní test), založený na měření duální fluorescence bakteriálních a plicních epiteliálních buněk značených barvivou PKH. S pomocí tohoto testu jsme potvrdili, že specifické protilátky IgY proti lektinu PAIIL významně inhibují adhezi většiny testovaných kmenů *Pseudomonas aeruginosa* na lidské plicní buňky (až o 67 %), která je důležitým počátečním krokem při nástupu infekce. Po ověření ochranného účinku anti-PAIIL IgY na úrovni buněčných linií jsme se zaměřili na vývoj vhodného zvířecího modelu, který by napodoboval podmínky v plicích nemocných s CF a byl využitelný pro další studium CF. Koncept našeho experimentálního modelu vycházel z využití enzymu neuraminidasy, který odštěpuje terminální kyseliny sialové z

glykokonjugátů a tím vytváří receptory pro vazbu patogenů, včetně PA. Očekávali jsme, že působení tohoto enzymu navodí na povrchu epitelálních buněk dýchacích cest obdobné podmínky, jaké jsou v CF plicích. V experimentech neuraminidasa opravdu zvýšila míru adheze PA nejen na plicní buněčné linie (až o téměř 50 %), ale také významně zvýšila náchylnost myši k rozvoji zánětu a poškození plic v důsledku infekce PA vyvolané dávkou 5×10^5 CFU. Tento experimentální zvířecí model lze dále využít k testování ochranného účinku anti-PAIIL a případně dalších sloučenin proti infekci PA.

Výstupy předkládané disertační práce mohou napomoci k realizaci důležitého úkolu, kterým je prevence chronické kolonizace pacientů s cystickou fibrosou patogenem *Pseudomonas aeruginosa*.

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is one of the relatively common inherited diseases caused by a mutation in the gene encoding for CFTR protein, which forms a chloride channel that significantly affects ion homeostasis and the associated fluid management of the cell. This disease mainly affects the respiratory and digestive systems, being the most life-threatening in the respiratory tract. Patients with CF suffer from frequent and recurrent respiratory infections that lead to the development of chronic inflammation and gradual destruction of lung tissue. These lung infections, which are caused mostly by the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, are the most common cause of morbidity and mortality in these patients. At present, antibiotics are used in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections, but new methods of antibacterial therapy need to be found to overcome the development of resistance. In addition to active immunization of CF patients against *Pseudomonas aeruginosa*, their passive immunization with specific chicken antibodies directed against this pathogen offers promising possibilities.

This dissertation thesis is aimed to verify the prophylactic potential of hen IgY antibodies against the virulence factor *Pseudomonas aeruginosa* - lectin PAIIL, and to further develop an experimental animal model mimicking the respiratory tract conditions in patients with CF, which would be suitable for studying the prevention of PA infections.

The obtained results confirm that yolk IgY (at a dose of 1 mg/ml for 24 hours) does not induce the production of tested proinflammatory cytokines in lung epithelial cells, which levels are comparable to physiological values in human serum. Thus, IgY does not have an inflammatory effect on lung cells and could be used to prevent bacterial infections of the respiratory tract. To test the prophylactic potential of IgY antibodies, we developed an experimental system (adhesion test) based on dual fluorescence measurements of PKH-labeled bacterial and lung epithelial cells. Using this assay, we confirmed that specific IgY antibodies against the PAIIL lectin significantly inhibited the adhesion of majority of tested *Pseudomonas aeruginosa* strains to human lung cells (up to 67 %), which is an important initial step in the onset of infection. After verifying the protective effect of anti-PAIIL IgY at the level of cell lines, we focused on the development of a suitable animal model that would mimic the conditions in the lungs of patients with CF and be useful for further study of CF. The concept of our experimental model was based on the use of the enzyme neuraminidase, which cleaves terminal sialic acids from glycoconjugates and thus creates receptors for the binding of pathogens,

including PA. We expected that this enzyme would induce conditions similar to those in CF lungs on the surface of airway epithelial cells. Indeed, in experiments, neuraminidase increased the rate of PA adhesion not only to lung cell lines (by almost 50%) but also significantly increased the susceptibility of mice to inflammation and lung damage due to the PA infection induced by a dose 5×10^5 CFU. This experimental animal model can be further used to test the protective effect of anti-PAIIL and possibly other compounds against PA infection.

The results of the presented dissertation thesis contributed to solving the important task, which is the prevention of chronic colonization of patients with cystic fibrosis by the pathogen *Pseudomonas aeruginosa*.

Obsah

1.	Teoretický úvod	12
1.1.	Cystická fibrosa	13
1.1.1.	Funkce a struktura CFTR chloridového kanálu	14
1.1.2.	Patofyziologie respiračního traktu u nemocných cystickou fibrosou	16
1.1.2.1.	Glykosylace epitelu respiračního traktu.....	17
1.1.2.2.	Změny v glykosylaci glykokonjugátů u pacientů s cystickou fibrosou	19
1.1.2.3.	Příčiny a důsledky změn v glykosylaci glykokonjugátů u pacientů s cystickou fibrosou	21
1.2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> a její virulenční faktory.....	23
1.2.1.	Lektiny <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAII a PAIIL	25
1.3.	Rozvoj infekce <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
1.4.	Odpověď hostitele na infekci <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
1.5.	Terapeutické přístupy k cystické fibrose	31
1.5.1.	Aktivní a pasivní imunizace proti <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
1.5.2.	Struktura imunoglobulinů IgY a IgG	36
1.5.3.	Funkční srovnání savčích a ptačích imunoglobulinů	40
1.5.4.	Výhody slepičích žloutkových imunoglobulinů IgY	41
1.6.	Experimentální modely pro studium cystické fibrosy	43
2.	Cíle disertační práce	47
3.	Výsledková část	49
3.1.	Příložená publikace č. 1	51
3.2.	Příložená publikace č. 2	61
3.3.	Příložená publikace č. 3	75
3.4.	Příložená publikace č. 4	87
4.	Závěr	101
5.	Použitá literatura	104

Seznam použitých zkratk

A549	buněčná linie odvozená z plicního adenokarcinomu 58letého pacienta
ABC	"Adenine nucleotide-binding cassette"
ASL	plicní povrchová kapalina (z angl. Airway surface liquid)
BAL	tekutina z bronchoalveolární laváže
CaCC	"Calcium-activated chlorid channel"
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CBE	"Chloride bicarbonate exchanger"
CF	cystická fibrosa
CFTR	"Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator"
CFU	"Colony forming units"
CuFi	buněčné linie plicního epitelu pacienta s cystickou fibrosou
ELISA	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
ENaC	"Epithelial sodium channel"
ER	endoplasmatické retikulum
Fab	fragment imunoglobulinu (z angl. Antigen binding)
Fc	fragment imunoglobulinu (z angl. Fragment crystallizable)
Fv	fragment imunoglobulinu (z angl. Fragment variable)
Gal	galaktosa
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
Glc	glukosa
GM1	monosialotetrahexosylgangliosid
GM-CSF	"Granulocyte-macrophage colony stimulating factor"
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
LPS	bakteriální lipopolysacharid
MSD	"Membrane-spanning domain"
MUC	mucin

NBD	"Nucleotide-binding domain"
NuLi	buněčné linie plicního epitelu zdravého jedince
ORCC	"Outward rectifying chloride channel"
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAiIL	lektin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (též označovaný jako LecB)
PBS	„Phosphate buffered saline“
PCL	mezirasinková kapalina (z angl. Periciliary liquid)
PcrV	„hrotový“ protein sekretovaný bakteriálním sekrečním systémem
PMN	polymorfonukleární neutrofilní buňky
RD	"Regulatory domain"
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive Oxygen Species)
SA	kyselina sialová
TMD	"Transmembrane domain"
TNF-α	"Tumor necrosis factor α "

1. Teoretický úvod

1.1. Cystická fibrosa

Cystická fibrosa (CF) je genetické autosomálně recesivní onemocnění vyvolané mutacemi genu pro transmembránový protein CFTR (z angl. Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Nejčastějším projevem této nemoci, který je pozorován již brzy po narození, jsou infekce dýchacích cest. Plíce pacientů jsou kolonizovány nejprve bakterií *Staphylococcus aureus* a *Haemophilus influenzae*, a následně dochází k rozvoji infekce způsobené *Pseudomonas aeruginosa*, která je detekována až u 80 % dospělých pacientů s CF (Fila 2014). V průběhu onemocnění se pacienti mohou nakazit i méně obvyklými a obtížněji léčitelnými patogeny, jako jsou *Burkholderia cepacia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia* nebo mykobakterie (De Boeck 2020). Co se týče mykotických plicních infekcí, tak nejčastěji pozorovaným původcem u CF nemocných je *Aspergillus fumigatus* nebo různé druhy *Candida* (Eschenhagen a kol. 2021; Malhotra a kol. 2019). Chronické infekce těmito patogeny vedou k poškození plicního epitelu, které se projevuje poklesem plicních funkcí a respirační nedostatečností.

Dalšími typickými projevy cystické fibrosy jsou poruchy v rámci gastrointestinálního traktu, kdy pacienti často trpí deficiencí sekretů pankreatu a s tím spojenou celkovou podvýživou. Nemalou měrou je zasažena i funkce reprodukčních orgánů, kdy je až 98 % mužů a 50 % žen postiženo sterilitou (Jones a Walshaw 2015). Dochází také k narušení metabolismu potních žláz, které je doprovázeno nadměrnou ztrátou solí potem a mnoha dalším komplikacím (Vávrová a kol. 1999). Zatímco symptomy CF, které se projevují v trávicím traktu, se daří poměrně kompenzovat díky podávání enzymových přípravků, nejčastější, a z hlediska ohrožení života nejzávažnější, je postižení dýchacích cest. Respirační onemocnění je nejčastější příčinou úmrtí či důvodem transplantace plicní tkáně u CF nemocných (De Boeck 2020).

Příčinou většiny zmíněných klinických příznaků je tvorba velmi vazkého hlenu na povrchu epitelálních buněk s nefunkčním CFTR chloridovým kanálem. K zahuštění sekretovaného hlenu dochází díky nedostatečnému transportu chloridových iontů CFTR kanálem přes membránu buňky a s tím spojené nadměrné absorpci Na^+ iontů a vody do buňky, což vede k dehydrataci hlenové vrstvy na povrchu buněčného epitelu (Skalická 2014). CFTR protein hraje tedy klíčovou roli v onemocnění cystickou fibrosou.

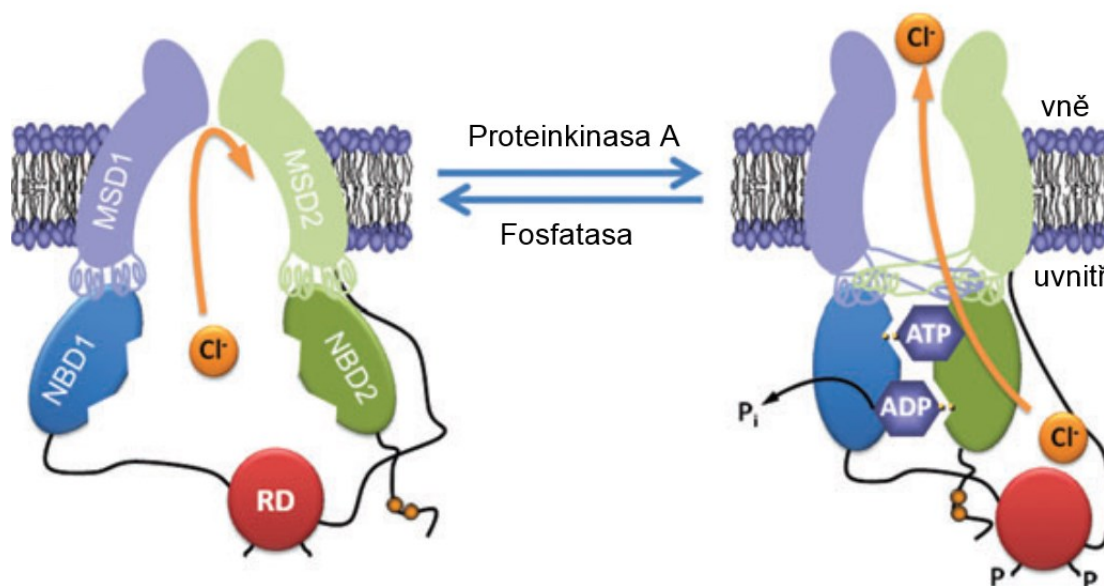
1.1.1. Funkce a struktura CFTR chloridového kanálu

CFTR protein funguje jako chloridový kanál na apikální části membrány epiteliálních buněk mnoha orgánů regulovaný cAMP (Pier a kol. 1997). Jedná se o důležitý protein, který významně ovlivňuje homeostázi iontů a s ní spojené hospodaření buňky s tekutinami. Tento proteinový kanál hraje důležitou roli v činnosti několika dalších iontových kanálů jako je např. sodíkový kanál ENaC (z angl. Epithelial sodium Channel) nebo dva důležité chloridové transportéry - ORCC (z angl. Outward Rectifying Chloride Channel) a vápníkem aktivovaný CaCC (z angl. Calcium-activated Chloride Channel) či kanál pro antiport chloridových a hydrogenuhličitánových iontů CBE (z angl. Chloride Bicarbonate Exchanger) (Stutts a kol. 1995; Berdiev a kol. 2009; Wei a kol. 1999; Borthwick a kol. 2016; webový zdroj č. 1). Kromě iontových kanálů CFTR protein ovlivňuje též regulaci sekrece glukagonu (Edlund a kol. 2017) nebo aktivitu aquaporinů, selektivních transportérů vody přes plazmatickou membránu. (Alves a kol. 2015). V neposlední řadě slouží CFTR protein i jako internalizační - fagocytární receptor pro oportunní mikroorganismy, zejména pak pro *Pseudomonas aeruginosa* (Vávrová 2006).

Protein CFTR je řazen mezi tzv. ABC transportéry (z angl. Adenine nucleotide-Binding Cassette), které zajišťují transport látek proti koncentračnímu gradientu za současné hydrolýzy ATP. Strukturně je CFTR protein tvořen jedním řetězcem s 1480 aminokyselinami, seskupenými do pěti funkčních domén, které svými konformačními změnami regulují průtok chloridových iontů kanálem (Riordan a kol. 1989; Welsh a Smith 1993). Jedná se o dvě transmembránové domény (tzv. MSD z angl. Membrane-spanning domain, někdy označované též jako TMD z angl. Transmembrane domain), které tvoří vlastní iontový kanál, dále dvě nukleotid vázající domény NBD (z angl. Nucleotide-binding domain), jež se v cytoplazmatické části buňky napojují na MSD domény a jejichž funkcí je vázat nukleotidy, převážně ATP. Pátou, nepárovou doménou je regulační doména RD (z angl. Regulatory Domain), která plní funkci „uzávěru“ chloridového kanálu a obsahuje vazebné místo pro proteinkinasu A (Carson a kol. 1995; Vankeerberghen a kol. 2002).

Otvírání a zavírání chloridového kanálu je regulováno dvěma oddělenými procesy, fosforylací regulační domény a vazbou ATP na NBD domény s jeho následnou hydrolýzou. V zavřeném stavu je regulační doména defosforylována a tvoří tak stérickou zábranu mezi NBD doménami, kanál je tedy pro Cl^- ionty neprůchodný. Fosforylace RD domény cAMP dependentní proteinkinasou umožní vzájemnou interakci obou NBD

domén a vazbu dvou molekul ATP. Po hydrolýze ATP na NBD1 dojde ke konformační změně a otevření CFTR kanálu pro průchod chloridových iontů směrem ven z buňky. Deaktivace kanálu nastává po hydrolýze druhé molekuly ATP navázané na NBD2, kdy dochází k rozpadu dimeru NBD domén a úplný návrat do původního stavu je umožněn defosforylací RD domény, která je katalyzována fosfatase (Sheppard a Welsh 1999; Csanády 2019). Schematicky jsou uvedené procesy znázorněny na obrázku č.1.



Obrázek 1: Mechanismus otvírání resp. zavírání CFTR kanálu: zjednodušený model ukazuje CFTR kanál v zavřeném (vlevo) nebo aktivovaném (vpravo) stavu. Zkratky: MSD - transmembránové domény, NBD – nukleotid vázající doména, RD – regulační doména, P - fosforylace regulační domény, Pi - anorganický fosfát, popisky „vně“ a „uvnitř“ označují intra- a extracelulární stranu membrány. *Převzato a upraveno z: Hwang a Sheppard 2009.*

V lidském genomu je gen pro CFTR protein lokalizován na dlouhém raménku 7. chromozomu a v současné době je popsáno více než 2000 mutací tohoto genu (De Boeck 2020; webový zdroj č. 2). Nejčastější mutací genu *CFTR*, která se vyskytuje alespoň na jedné alele u 95 % pacientů je delece tří párů bází vedoucí ke ztrátě aminokyseliny fenyylalaninu v pozici 508 (označovaná jako Phe508del), který je součástí povrchu nukleotid vázající domény 1 (NBD1) proteinu CFTR (Meng a kol. 2017; Hwang a Sheppard 2009). Důsledkem této mutace je chybné sbalení CFTR proteinu a jeho následná degradace v proteasomech znemožňující začlenění proteinu do plazmatické membrány (Jilling a Kirk 1997). Další poměrně časté typy mutací jsou např. Gly542X, Gly551Asp, Trp1282X, Asn1303Lys a Arg553X (Fila 2014; Zielenski 2000), ostatní

modifikace *CFTR* genu se v populaci vyskytují s četností menší než 1 %. Na rozdíl od mutace Phe508del, velká část mutací vede sice k expresi mutantních proteinů a jejich začlenění do membrány, tyto strukturně pozměněné proteinové kanály však již nejsou schopné správným způsobem transportovat chloridové ionty (De Boeck a Amaral 2016). Nepřítomnost proteinu CFTR v buněčné membráně či jeho snížená schopnost transportu Cl^- iontů je spojena se změnou složení povrchové tekutiny dýchacích cest (ASL z angl. Airway surface liquid) a ztrátou schopnosti internalizace mikroorganismů prostřednictvím endocytózy s následným odstraněním bakterií z dýchacího traktu, což způsobuje zvýšenou bakteriální zátěž v plicích (Pier 2000).

1.1.2. Patofyziologie respiračního traktu u nemocných cystickou fibrosou

Jedním z obranných mechanismů respiračního traktu je tvorba hlenu, v němž jsou zachytávány vdechnuté částice a patogeny. Na povrchu plicních epitelálních buněk je tenká vrstva plicní povrchové tekutiny, která je tvořena dvěma vrstvami, periciliární kapalinou (PCL, z ang. Periciliary liquid), která umožňuje pohyb řasinek, a na ně nasedající hlenovou vrstvou. Hlen je pak díky řasinkám posouván spolu se zachycenými částicemi směrem k horním cestám dýchacím. Mezi těmito dvěma vrstvami existuje osmotická rovnováha, která má přímý vliv na distribuci vody v ASL. Nefunkční či chybějící CFTR kanál způsobuje u pacientů s CF porušení této osmotické rovnováhy a následně dehydrataci a zahuštění hlenu, který znemožní pohyb řasinek a tím i odstranění vdechnutých patogenů (Button a kol. 2012).

Vrstva hlenu je tvořena vysokomolekulárními muciny (až několik MDa), glykokoproteiny s různě členitými sacharidovými řetězci, jejichž terminální struktury jsou důležité při rozpoznávání a případné adhezi patogenů na povrch epitelálních buněk respiračního traktu. Právě změny v glykosylaci těchto struktur u CF nemocných hrají významnou roli v patogenezi cystické fibrosy (Scanlin a Glick 1999).

1.1.2.1. Glykosylace epitelu respiračního traktu

Glykosylace je proces kovalentního připojení sacharidové složky k proteinu enzymovými kotranslačními nebo posttranslačními reakcemi, který probíhá v endoplazmatickém retikulu nebo Golgiho aparátu. Sacharidová část může být vázána *O*-glykosidovou vazbou na postranní řetězec aminokyselin serinu či threoninu (*O*-glykoproteiny) nebo *N*-glykosidickou vazbou na postranní řetězec asparaginu (*N*-glykoproteiny). Syntéza sacharidové části *N*-glykoproteinů je komplikovanější a probíhá v několika krocích. Nejprve je na cytosolární straně endoplazmatického retikula syntetizováno tzv. „core“ oligosacharidu, které je tvořeno 7 monosacharidovými jednotkami. Tato základní část sacharidového řetězce je následně pomocí flipasy přenesena dovnitř endoplazmatického retikula, kde pokračuje syntéza sacharidového prekurzoru až do celkové délky čtrnácti monosacharidových jednotek za účasti několika typů glykosyltransferas. Vzniklý oligosacharid je následně připojen *N*-glykosidovou vazbou v místě *N*-glykosylační sekvence na vznikající protein, jedná se tedy o kotranslační modifikaci (glykosylaci). Uvnitř endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu pak probíhají pomocí glykosylačního enzymového aparátu (glykosidasy a glykosyltransferasy) další úpravy a syntéza výsledného polysacharidového řetězce. U *O*-glykoproteinů dochází k syntéze sacharidového řetězce postupným připojováním jednotlivých aktivovaných monosacharidů opět pomocí příslušných glykosyltransferas. Proces *O*-glykosylace probíhá převážně v jednotlivých oddílech Golgiho aparátu a na rozdíl od *N*-glykosylace není pro vazbu prvního monosacharidu vyžadována v peptidovém řetězci žádná specifická sekvence, příslušná aminokyselina (konkrétní serin či threonin) musí být pouze prostorově dostupná. Další odlišností syntézy *O*-glykosidicky vázaného sacharidového řetězce je to, že probíhá posttranslačně na již hotovém a sbaleném proteinu (Voet a Voet 2006). Glykosylace proteinů je běžnou modifikací těchto biomolekul určených pro plnění řady metabolických funkcí v extracelulárním prostředí, jako je například hydratace epitelu a zajištění viskozity hlenu, zachycení patogenních částic a tvorba slizniční bariéry.

Dysfunkce CFTR proteinového kanálu při onemocnění cystickou fibrosou ovlivňuje glykosylaci mnoha typů glykokonjugátů včetně samotného CFTR proteinu (Du a Lukacs 2009). Jak již bylo zmíněno, CFTR chloridový kanál je glykoprotein, který má ve své proteinové části čtvrté extracelulární smyčky dvě *N*-glykosylační místa, asparaginy v pozicích 894 a 900. Vlivem mutace jeho proteinové části typu Phe508del

dochází k nesprávné kotranslační glykosylaci, která je příčinou chybného sbalení proteinu a ztráty či zhoršení jeho biologické funkce (Scanlin a Glick 1999; O’Riordan a kol. 2000).

Jak je uvedeno výše, další skupinou glykokonjugátů, jejichž změny v glykosylaci sacharidových řetězců přímo ovlivňují patogenezi CF, jsou muciny, které tvoří významnou složku dýchacích cest. Muciny obsahují převážně *O*-glykosidicky a v menší míře i *N*-glykosidicky vázané sacharidové řetězce (Alhadeff 2008). Pro proteinovou část *O*-glykosidicky vázaných mucinů je charakteristický obsah rozsáhlých oblastí bohatých na serinové a threoninové zbytky („Tandem repeat“ domény), na které jsou přes *N*-acetylgalaktosamin (GalNAc) navázány sacharidové řetězce v délce od krátkých monosacharidových nebo disacharidových jednotek až po velké, protáhlé a rozvětvené polysacharidové struktury (Van Den Steen a kol. 1998). Sacharidová část (často označovaná jako glykanová část) mucinů obsahuje různé typy monosacharidových jednotek včetně hojně zastoupené galaktosy, fukosy, manosy, *N*-acetylglukosaminu nebo terminální kyseliny sialové (SA) (Venkatakrishnan a kol. 2013).

Muciny dýchacího traktu jsou produkovány epiteliálními buňkami a mohou se vyskytovat ve dvou formách, buď jako membránové nebo sekretované, kdy jsou součástí mukusu. Solubilní, sekretované, muciny se tvoří v epiteliálních buňkách submukózních žláz a gobletových (pohárkových) buňkách. Jedná se převážně o muciny MUC5AC, MUC5B, MUC2, MUC8 a MUC19 (Venkatakrishnan a kol. 2013). Mnoho sekretovaných mucinů tvoří rozsáhlé oligomerní komplexy z polypeptidových řetězců vzájemně spojených disulfidickými vazbami. Vzniklé komplexy glykokonjugátů se vyznačují viskoelastickými vlastnostmi a také schopností vázat vodu, což umožňuje vznik mukózní vrstvy chránící membrány slizničních povrchů. Naproti tomu membránové muciny jsou součástí membrán epiteliálních buněk dýchacích cest a jsou produkovány jak ciliárním tak i nonciliárním epitelem. Ve srovnání s mukózními muciny mají membránové muciny menší velikost a netvoří polymerní struktury. Do této skupiny mucinů patří např. MUC1, MUC4 a MUC16 (Voynow a Rubin 2009; Hattrup a Gendler 2008).

Díky svým antimikrobiálním a protizánětlivým vlastnostem muciny napomáhají imunitnímu systému v obranyschopnosti organismu (McGuckin a kol. 2011). K tomu však dochází pouze za předpokladu, že je udržována jednak správná rovnováha mezi objemem a chemickým složením mukoidního sekretu a periciliární tekutinou, a dále účinná mukociliární „clearance“ pomocí plně funkčního řasinkového epitelu. U pacientů s CF dochází v důsledku zvýšeného počtu mukózních žláz (hyperplasie) k nadměrné

sekreci mukusu. Zvýšení viskozity hlenu vlivem jeho snížené hydratace (díky iontové disbalanci způsobené nefunkčním CFTR chloridovým kanálem) narušuje výše zmíněnou rovnováhu a zhoršuje mukociliární „clearance“. Tyto děje vedou k hromadění hustého hlenu v dýchacích cestách a jejich ucpávání. Původně výhodné vlastnosti mukoidního sekretu napomáhajícího vrozené imunitě se mění v nežádoucí, které vedou ke zvýšené náchylnosti k adhezi patogenů a jejich snížené eliminaci z respiračního traktu, což má za následek rozvoj chronického zánětu a postupnou destrukci plicní tkáně (Smith 1997).

1.1.2.2. Změny v glykosylaci glykokonjugátů u pacientů s cystickou fibrosou

Glykosylace mucinů je tzv. proteinově a buněčně specifický proces, jež je silně závislý jak na konkrétním proteinu, tak i na typu buňky, ve které je mucin syntetizován. V neposlední řadě může být proces glykosylace ovlivněn i fyziologickým stavem buňky (Parekh a kol. 1985).

Abnormální glykosylaci podléhají jak sekretované, tak i membránové muciny (Venkatakrishnan a kol. 2013), přičemž změna v sacharidovém složení může nastat v terminální části glykanu, v jeho anténové části nebo i v jeho „core“ a týká se jak *O*-glykosydicke (Breg a kol. 1987), tak i *N*-glykosydicke vázaných glykanů (Alhadeff 2008). Charakteristické změny v glykosylaci mucinů pacientů s CF nastávají převážně v míře fukosylace a sialylace (především terminálních částí) sacharidových řetězců. Dalším poměrně častým typem úpravy glykanové části mucinů, který je u zmíněných jedinců ovlivněn, je sulfatace. Profily glykosylace mucinů u pacientů s CF popsané v literatuře se mnohdy značně liší, lze v nich však vysledovat několik trendů. Již před několika desítkami let Matthews a kol. (1963) zjistili, že pro sekretované muciny, vyskytující se ve sputu jedinců s CF, je charakteristický pokles jejich celkové glykosylace. Tento jev je popisován i v případě membránových mucinů dýchacích cest (Martino a kol. 2011). Trendy jednotlivých specifických glykosylačních úprav se však u membránových i sekretovaných mucinů významně liší. Sekretované muciny dýchacích cest vykazují u pacientů s CF vyšší stupeň sialylace a sulfatace (v závislosti na typu mucinů a studii) a nižší stupeň fukosylace ve srovnání se zdravými jedinci. U membránových mucinů byl naopak pozorován u těchto typů úprav zcela opačný trend, tedy zvýšená míra fukosylace a snížení sialylace u nemocných CF (Venkatakrishnan a kol. 2013).

Při sialylaci dochází k navázání kyseliny sialové často ve formě kyseliny *N*-acetylneuraminové na terminální monosacharidový zbytek galaktosy nebo *N*-acetylglukosaminu, a to prostřednictvím dvou typů vazeb $\alpha 2,3$ a $\alpha 2,6$. U sekretovaných mucinů, produkovaných pohárkovými buňkami zdravých jedinců, převažuje vazba na galaktosu typu $\alpha 2,3$, zatímco u membránových mucinů produkovaných epiteliálními buňkami závisí typ vazby na jejich umístění v dýchacím traktu. Vazba kyseliny sialové typu $\alpha 2,6$ převažuje u membránových mucinů v celé délce respiračního traktu a vazba typu $\alpha 2,3$ je méně častá a vyskytuje se především u mucinů v dolních cestách dýchacích. Tyto dva různé typy vazby kyseliny sialové rozlišují např. viry lidské a ptačí chřipky, a proto mohou být tyto determinanty velice důležité pro virové i bakteriální infekce pozorované u pacientů s CF (Matrosovich a kol. 2004; Venkatakrishnan a kol. 2013).

Také míra fukosylace mucinů je velmi významná z hlediska ovlivnění adheze patogenů, především *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Haemophilus influenza*, prostřednictvím jejich lektinů. V kontextu s patogenezí CF se jako velmi důležitá jeví zvýšená míra fukosylace především u membránových mucinů lemuujících dýchací cesty. Fukosa slouží jako potenciální vazné místo pro patogeny, které pomocí svých lektinů tento sacharidový zbytek specificky rozpoznávají. Jak již bylo zmíněno u sekretovaných mucinů je pozorován opačný trend u CF jedinců, tedy nižší hladina fukosylace ve srovnání se zdravými jedinci. Fukosa může být vázána vazbou typu $\alpha 1,3$ nebo $\alpha 1,6$ na *N*-acetylglukosamin v anténní části či „core“ glykanu (Scanlin a Glick 1999), popřípadě k vazbě může být využita i galaktosa (Venkatakrishnan a kol. 2013). Hlavní patogen pacientů s CF, *Pseudomonas aeruginosa*, rozpoznává prostřednictvím svých lektinů právě fukosu vázanou typem vazby $\alpha 1,3$. U zdravých jedinců tento typ vazby fukosy nebyl na povrchu fibroblastů vůbec nalezen (Scanlin a Glick 1999).

Při dalším typu úpravy, sulfataci mucinů, dochází k připojení sulfátu na C3 galaktosy nebo na C6 *N*-acetylglukosaminu pomocí sulfotransferas. Změny v sulfataci mucinů u pacientů s CF pozorované v různých studiích jsou však protichůdné. Byla zaznamenána jak zvýšená (tento trend převládá obecně pro glykoproteiny sputa), tak i naopak snížená míra sulfatace mucinů a některé studie uvádějí, že mezi úrovní sulfatace mucinů u pacientů s CF a zdravých jedinců není statisticky významný rozdíl.

Další skupinou glykokonjugátů, důležitou z hlediska glykosylace u pacientů s CF, jsou glykolipidy. Konkrétně se jedná o změnu v sialylaci glykosfingolipidových struktur GM1 (gangliotetraosylceramid). Poměr asialoGM1:sialoGM1 glykolipidů na povrchu

buněk dýchacích cest u pacientů s CF je vyšší než u zdravých jedinců a převažuje u nich tedy nesialovaná forma glykolipidu, která funguje opět jako receptor pro patogeny PA (či *Haemophilus influenzae* a *Staphylococcus aureus*), jenž je rozpoznáván bakteriálními pili. Tyto struktury jsou tvořeny vláknitým proteinem pilinem, který se svoji C-koncovou částí váže na GalNAc(β1,4)Gal sekvenci glykolipidu asialoGM1 (Scharfman a kol. 1996). U sialované formy GM1 glykolipidu však k rozpoznání a následné vazbě patogenu nedochází (Saiman a Prince 1993; Scharfman a kol 1999)

1.1.2.3. Příčiny a důsledky změn v glykosylaci glykokonjugátů u pacientů s cystickou fibrosou

Hledání a identifikace přímé příčiny změn v glykosylaci mucinů u pacientů s CF je velmi obtížné, neboť enzymové glykosylační systémy mohou být ovlivněny mnoha endogenními, ale i exogenními faktory. Obecně tyto faktory můžeme rozdělit do dvou kategorií: 1) mechanismy, které narušují rovnováhu glykosylačního aparátu v buňce, a 2) mechanismy, které různými způsoby mění již zralý glykosylační profil mucinů, kdy dochází ke změnám v jejich složení. Do první skupiny patří např. změna hladin glykosylačních enzymů nebo jejich substrátů (nukleotidem aktivovaný sacharidový zbytek) či změna v lokalizaci příslušných enzymů v rámci ER/Golgiho aparátu. Druhou skupinu tvoří procesy, při nichž dochází např. k degradaci glykanové části bakteriálními glykosidasami, které mohou demaskovat glykanové receptory, nebo ke změně v sekreci jednotlivých mucinů, která nesouvisí se změnou glykosylačního aparátu buňky (Cacalano a kol. 1992).

Z mnoha pozorování vyplývá, že absence plně funkčního CFTR proteinu v membránách mukoidních buněk vede k narušení jejich glykosylačního enzymového aparátu. Například snížení celkové glykosylace mucinů bronchiálních epiteliálních buněk koreluje se sníženou expresí manosa-6-fosfát-isomerasy, která aktivuje manosu při syntéze „core“ při N-glykosylaci (Virella-Lowell a kol. 2004). Naopak zvýšená míra N-glykosylace povrchu CF epitelu nárůstem genové transkripce tohoto enzymu vedla ke snížení adheze *Pseudomonas aeruginosa* a zlepšení „clearance“ tohoto patogenu v dýchacích cestách (Martino a kol. 2011). Dalším glykosylačním enzymem, jehož snížená aktivita byla detekována v CF buněčných kulturách je sialyltransferasa (Barasch a Al-Awqati 1993). Pokles aktivity tohoto enzymu je spojený se sníženou mírou

terminální sialylace glykanů. Stejný efekt, pozorovaný u heterologního buněčného systému exprimujícího Phe508del CFTR protein, je navíc doprovázen sníženou hladinou samotné kyseliny sialové (Dosanjh a kol. 1994). Stejně tak změny v aktivitě a obsahu α 1,2-fukosyltransferasy vedou k poklesu množství fukosy vázané vazbou α 1,2 na galaktosu membránových mucinů dýchacích cest (Glick a kol. 2001).

Dosud však není přesně známo, jakým mechanismem absence či defektní aktivita CFTR kanálu ovlivňuje multienzymový glykosylační aparát, zdali přímo či nepřímo prostřednictvím různých meziproductů signalizačních drah. Podle hypotézy Barashe a kol. (1991) způsobí nefunkční CFTR protein snížení pH v Golgiho aparátu, což vyvolá změnu aktivity glykosyltransferas díky odchylce od jejich pH optima. Jiná teorie uvádí, že nativní CFTR protein se podílí na správném umístění (kompartmentaci) jednotlivých terminálních glykosyltransferas v rámci Golgiho aparátu tak, aby při glykosylaci daného proteinu docházelo k zapojení patřičného enzymu. Např. pokud dvě terminální glykosyltransferasy, α 1,2- a α 1,3-fukosyltransferasy kompetují o stejný substrát, fukosu, a dojde ke změně pořadí v zapojování těchto dvou enzymů do procesu glykosylace, α 1,3-fukosyltransferasa bude působit jako první, druhý enzym se už neuplatní a na povrchu buněk CF jedinců bude převažovat fukosa připojená vazbou α 1,3, která je rozpoznávána patogenem PA (Rhim a kol. 2001).

Jak již bylo zmíněno, glykosylační profil pozorovaný u nemocných s CF může být ovlivněn také přítomností bakterií jako je *Pseudomonas aeruginosa* a dalších v respiračním traktu. Tyto patogeny mají na svém povrchu specifické glykosidasy, např. sialidasy, pomocí nichž mohou demaskovat glykanové receptory na povrchu hostitelských buněk, které pak využijí pro svoji adhezi (Cacalano a kol. 1992). Přítomnost bakterií v dýchacím traktu může dále vyvolávat a udržovat zánět, který ovlivňuje fyziologický stav buňky, a tím opět modifikovat glykosylační profil mucinů prostřednictvím zánětlivých mediátorů, které se podílejí na regulaci glykosyltransferas a sulfottransferas (Delmotte a kol. 2002).

Uvedené poznatky naznačují, že terminální glykosylace povrchových glykokonjugátů, zejména její změny a typ vazby koncových monosacharidových jednotek, velmi významně ovlivňuje míru adheze patogenů kolonizujících dýchací cesty pacientů s CF. Abnormální glykosylace slizničních proteinů i lipidů je primárně spojena se zvýšenou mírou bakteriální infekce díky zvýšené adhezi patogenů, a zároveň snížení jejich „clearance“ z prostředí respiračního traktu. Také samotný CFTR protein na povrchu

epiteliálních buněk zdravých jedinců se může podílet na internalizaci patogenu *Pseudomonas aeruginosa*, glykosylovaná část CFTR proteinu však do této interakce s patogenem není zapojena (Pier a kol. 1997). Absence CFTR kanálu u CF nemocných tak přispívá k dalšímu bakteriálnímu zatížení jejich dýchacích cest.

1.2. *Pseudomonas aeruginosa* a její virulenční faktory

Jedním z nejvýznamnějších patogenů u pacientů s cystickou fibrosou je gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Infekce a chronická kolonizace plic tímto mikroorganismem je hlavní příčinou morbidity a mortality CF jedinců. Prevalence infekce PA stoupá u pacientů s CF s věkem a jak bylo naznačeno výše, v dospělosti je chronicky infikováno až 80 % nemocných. Jednou z možných příčin této hypersenzitivity k bakteriální infekci právě *Pseudomonas aeruginosa* může být aberace CFTR proteinu, jehož extracelulární doména (úsek aminokyselinového řetězce 108 – 117) slouží jako internalizační PA-specifický receptor (Pier 2000). V případě funkčního CFTR proteinu u zdravých jedinců je bakterie PA, prostřednictvím lipopolysacharidu (LPS) na povrchu buněčné stěny, zachycena k membráně epiteliálních buněk. Poté následuje endocytosa (a degradace bakteriální buňky pomocí lysozomálních hydrolytických enzymů a baktericidních látek) a/nebo odstranění PA deskvamací epiteliálních buněk s internalizovanými patogeny. Nejčastěji se vyskytující mutace Phe508del neovlivňuje samotnou schopnost CFTR proteinu vázat bakteriální LPS, ale v jejím důsledku nedochází k začlenění CFTR do membrány a jeho absence tak vede ke zvýšení bakteriální zátěže plic nemocných s CF (Pier 2000; Pier a kol. 1997). Navíc změnou glykosylačního profilu epiteliálních buněk respiračního traktu u pacientů s CF vznikají nové povrchové struktury vhodné pro adhezi bakterií, převážně *Pseudomonas aeruginosa*. V těchto případech však již nedochází k prospěšné fázi internalizace a likvidace patogenu, ale naopak nastává rozvoj bakteriální infekce.

Primární rozpoznání hostitele, adheze PA a následná kolonizace jsou úzce spjaty s jejich virulenčními faktory. Jedná se o sloučeniny či komponenty, které se významně uplatňují v patogenitě mikroorganismu. Můžeme je rozdělit do dvou kategorií: 1) virulenční faktory asociované s povrchem bakteriální buňky, a 2) extracelulárně sekretované faktory.

Do první skupiny patří např. bičíky či pili, které zajišťují nejen pohyblivost, ale jsou využívány i k adhezi bakterie na cílové struktury na povrchu epiteliálních buněk hostitele. Dalším adhezním faktorem je výše zmiňovaný bakteriální lipopolysacharid, který kromě interakce s CFTR epiteliálních buněk je také rozpoznáván povrchovými receptory buněk imunitního systému. Jedná se o velmi imunogenní bakteriální toxin, který již v malých koncentracích (v řádu pg/ml) je schopen vyvolat imunitní odpověď. Aktivuje komplement, vyvolává zánětlivou odpověď stimulací makrofágů, neutrofilů nebo B-lymfocytů a působí též jako pyrogen (Pier a kol. 1997). LPS také zvyšuje strukturní stabilitu a snižuje propustnost vnější bakteriální membrány, čímž se významně podílí na rezistenci PA vůči antibiotikům (Kucharska a kol. 2016). Neméně důležitými adhezními faktory jsou i bakteriální lektiny, zejména PAIL a PAIIL, které se účastní nejen vazby PA na cukerné složky glykokonjugátů na povrchu epiteliálních buněk hostitele, ale hrají i významnou roli při formování biofilmu (vysoce strukturovaný a organizovaný stupeň bakteriálního soužití), který zvyšuje odolnost bakterií a umožňuje jejich vzájemnou komunikaci (Glick a Garber 1983; Chemani a kol. 2009).

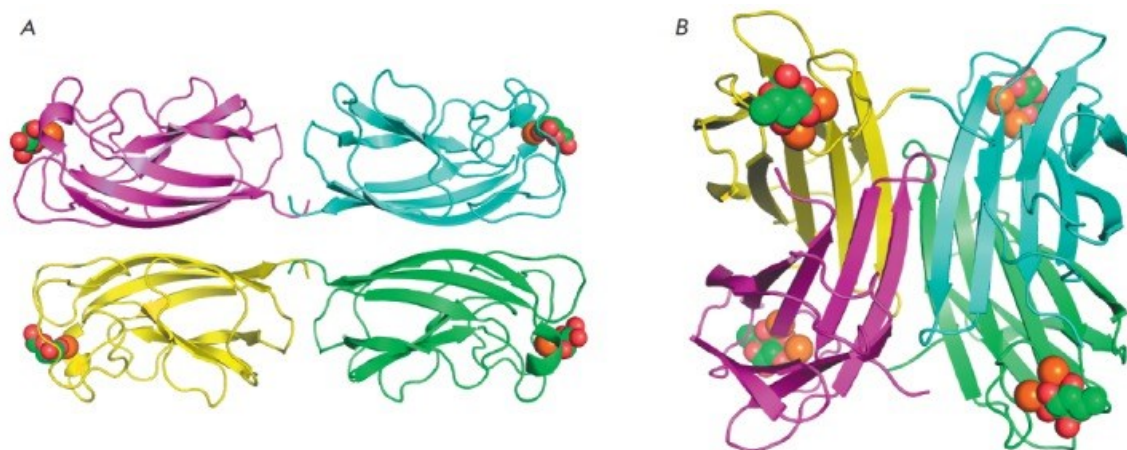
Druhá skupina virulenčních faktorů zahrnuje extracelulárně sekretované proteinové toxiny, enzymy nebo pigmenty, které usnadňují překonání imunitního systému hostitele. Jedná se například o exotoxin A nebo exoenzym S, které inhibují syntézu proteinů v hostitelských buňkách, což v konečném důsledku vede k jejich apoptose (Morlon-Guyot a kol. 2009). Mezi bakteriální toxiny se řadí i tzv. fenaziny, barevné pigmenty, které mají významný vliv na virulenci *Pseudomonas aeruginosa*. Přímě poškozují hostitelské buňky účastí na tvorbě reaktivních forem kyslíku, ovlivňují produkci cytokinů či inhibují pohyb řasinek řasinkového epitelu dýchacích cest (Hall a kol. 2016). Fenaziny působí toxicky na hostitelské buňky, ale svým producentům naopak prospívají, např. usnadňují přežití v anaerobním prostředí (Costa a kol. 2015). Příkladem těchto toxinů je pyocyanin, modrý pigment, který díky svým oxidačně redukčním vlastnostem poskytuje PA konkurenční výhodu nad jinými mikroorganismy v respiračním traktu pacientů s CF (Hassan a Fridovich 1980). Mezi siderofory, látky přenášející ionty železa, patří bakteriální žlutozelený pigment pyoverdin, který zásobuje PA ionty železa, které jsou nezbytné pro růst bakterií a také tvorbu biofilmu (Banin a kol. 2005; Murray a kol. 2016). *Pseudomonas aeruginosa* produkuje také řadu enzymů, nespecifických proteas (elastasy), či fosfolipas, které způsobují destrukci hostitelské tkáně. Jedním z důležitých enzymů, který hraje roli převážně v počátečním stadiu patogenese PA, je neuraminidasa (též sialidasa). Tento enzym štěpí glykosidovou vazbu

mezi terminální kyselinou sialovou a gangliosidem GM1 a přeměňuje tak sialoGM1 na asialoGM1, který slouží právě jako receptor pro vazbu PA na povrch buněk dýchacího traktu pacientů s CF (Cacalano a kol. 1992). Důležitým virulenčním faktorem, který se naopak masivně uplatňuje při vzniku chronické infekce je tvorba biofilmu. Být součástí biofilmu přináší bakteriálním buňkám výhody jako je ochrana před imunitním systémem hostitele, ale i před působením antibiotik anebo umožňuje překonání řady stresových podmínek (nedostatek živin, dehydratace, změna pH) (Gellatly a Hancock 2013). Navození tvorby biofilmu je regulováno tzv. systémem „quorum sensing“, který umožňuje komunikaci mezi bakteriemi prostřednictvím signálních molekul uvolňovaných do prostředí (Whiteley a kol. 2017).

1.2.1. Lektiny *Pseudomonas aeruginosa* PAIL a PAIIL

Dva z virulenčních faktorů, které jsou úzce spjaty s adhezí PA k hostitelským buňkám a které jsou součástí předkládané práce, jsou lektiny PAIL a PAIIL (v literatuře též označované jako LecA a LecB). Lektiny tvoří velkou skupinu proteinů, které s vysokou mírou specifity rozpoznávají cukerné struktury. V souvislosti s jedinečným glykosilačním profilem nemocných s CF hrají lektiny významnou roli v patogenezi *Pseudomonas aeruginosa* u těchto jedinců.

Lektiny PAIL a PAIIL byly izolovány z *Pseudomonas aeruginosa* v 70. letech jako proteiny schopné aglutinovat lidské a zvířecí erytrocyty (Gilboa-Garber 1972; Gilboa-Garber a kol. 1977). Oba lektiny jsou složeny z relativně malých monomerních jednotek tvořených 121 (PAIL) a 115 (PAIIL) aminokyselinami o velikosti molekul 12,8 kDa respektive 11,9 kDa (Avichezer a kol. 1992; Gilboa-Garber a kol. 2000). Přestože tyto lektiny mají zcela odlišné aminokyselinové sekvence, jejich kvarterní struktury jsou podobné: oba proteiny tvoří homotetramerní komplexy, přičemž každá monomerní jednotka obsahuje vazebné místo pro ligand. Jedna tetramerní molekula lektinu tedy může vázat až 4 molekuly odpovídajícího sacharidu, viz obr. 2 str. 26 (Cioci a kol. 2003; Mitchell a kol. 2002).



Obrázek 2: Celkový pohled na tetramery lektinů PA-IL (A) a PA-IIL (B). Jednotlivé monomerní jednotky jsou zobrazeny různými barvami, kde ploché šipky znázorňují struktury β -skládaného listu. Vápenaté kationty představují oranžové kuličky a příslušné monosacharidy jsou znázorněny pomocí zelených (uhlíkové atomy) a červených (kyslíkové atomy) kuliček. *Převzato z:* Grishin a kol. 2015

Lektin PAIL specificky rozpoznává terminální D-galaktosu vázanou v determinantech $\text{Gal}\alpha 1\text{-}3\text{Gal}$, $\text{Gal}\alpha 1\text{-}4\text{Gal}$ nebo $\text{Gal}\alpha 1\text{-}6\text{Glc}$ glykokonjugátů epiteliálních buněk dýchacích cest (Avichezer a kol. 1992; Chen a kol. 1998). Disociační konstanta komplexu PAIL - galaktosa charakterizující afinitu lektinu k příslušnému ligandu je $88\mu\text{M}$ (Kadam a kol. 2011), což je považováno za střední míru afinity. Afinita jednotlivých oligosacharidových determinantů k lektinu PAIL se může lišit v závislosti na složení této koncové části sacharidového řetězce (sekvenci monosacharidů) a na typu glykosidové vazby vázající terminální galaktosu, přičemž disociační konstanty pro tyto různé komplexy lektin - sacharid se obvykle pohybují v rozmezí $30 - 130\mu\text{M}$ (Blanchard a kol. 2008; Nurisso a kol. 2010). Kromě D-galaktosy může lektin PAIL vázat s nižší afinitou také N-acetyl-D-galatosamin (Gilboa-garber 1972; Garber a kol. 1992). Vazebné místo pro galaktosu obsahuje vápenatý kationt (koordinčně vázaný na atomy kyslíku karboxylových skupin postranních řetězců aminokyselin v proteinu) a dále molekulu vody, přičemž obě tyto komponenty se přímo účastní vazby cukerného zbytku (Cioci a kol. 2003; Nurisso a kol. 2010).

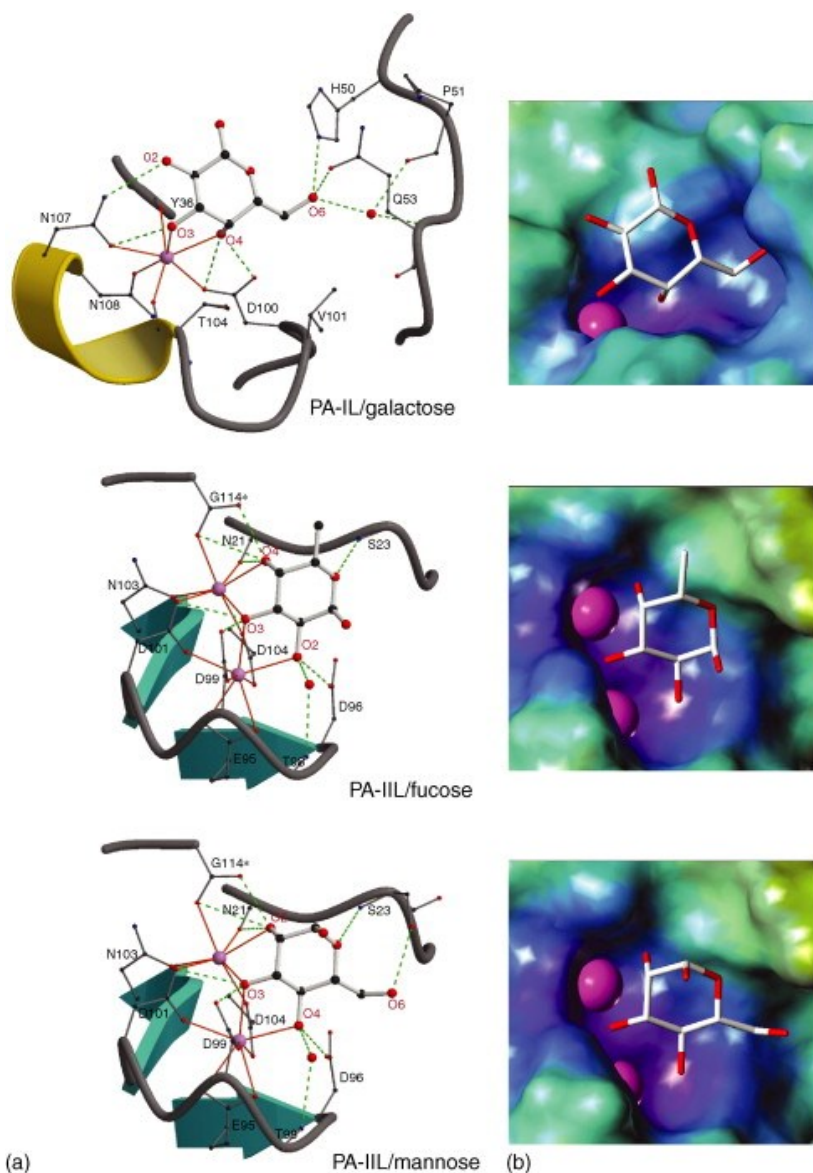
Lektin PAIIL má ve srovnání s lektinem PAIL širší vazebnou specifitu a vyšší afinitu ke svým ligandům. Může vázat L-fukosu, L-fukosylamin, L-galaktosu, D-arabinosu, D-manosu a D-fruktosu. Disociační konstanta komplexu PAIIL - L-fukosa je $2,9\mu\text{M}$, interakce s ostatními sacharidy je slabší (Sabin a kol. 2006). Důvodem této vysoké afinity lektinu je pravděpodobně to, že v jeho vazebném místě se nacházejí dva

ionty Ca^{2+} . Koordinační interakce těchto dvou vápenatých kationtů se sacharidy určují vazebnou specifitu lektinu PAIIL. Sacharidy s optimálním uspořádáním hydroxylových skupin mají ve svých energeticky nejvýhodnějších konformacích dvě hydroxylové skupiny v ekvatoriální poloze a jednu hydroxylovou skupinu v axiální poloze vůči referenční rovině sacharidového kruhu, a právě takové rozložení hydroxylových skupin umožňuje ideální interakci s vápenatými ionty (viz obr. 3, str. 28) (Loris a kol. 2003; Sabin a kol. 2006).

Pro funkci lektinů je důležitá jejich lokalizace. Většina jich je umístěna intracelulárně, významný podíl se však vyskytuje i na cytoplasmatické membráně, v periplasmatickém prostoru a na povrchu vnější membrány bakteriálních buněk, kde je hojně zastoupený převážně lektin PAIIL (Glick a Garber 1983; Loris a kol. 2003). Intracelulární lektiny se uplatňují převážně po autolýzi bakteriální buňky. K té dochází u některých buněk bakteriální kolonie kvůli dezintegraci buněčné stěny v důsledku ztráty regulace autolysinů, podílejících se na její remodelaci. Uvolněné cytoplasmatické lektiny následně umožní vyšší míru adheze intaktních bakterií. (Grishin a kol. 2015; Wentworth a kol. 1991)

Povrchové lektiny, jak bylo uvedeno výše, jsou zodpovědné za adhezi bakterií na epiteliální buňky hostitele. Sacharidové struktury, které jsou zmíněnými lektiny rozpoznávány, jsou u CF nemocných nadměrně zastoupené právě v membránových mucinech, které jsou charakteristické sníženou sialylací (demaskování předposledních zbytků galaktosy) a zvýšenou fukosylací (podrobněji viz. kapitola 1.1.2.2). Membránové muciny jsou tedy pravděpodobně počátečním místem adheze PA. Oproti tomu sekretované muciny ve sputu CF nemocných, které kvůli opačné situaci (se zvýšenou sialylací a sulfatací a sníženou fukosylací) obsahují ve srovnání se zdravými jedinci méně glykanových determinant rozpoznávaných lektiny PA by adhezi patogenu u pacientů s CF měly ovlivnit mnohem méně. (Venkatakrishnan a kol. 2013). Mezi další funkce obou lektinů patří i účast na tvorbě biofilmu. Multivalence lektinů umožňuje vzájemné interakce bakterií, jejich agregaci a tvorbu mikrokolonií. Proteiny PAIL a PAIIL se váží na exopolysacharidové řetězce biofilmu, které obsahují manosu a galaktosu, a tím dochází k jeho zahuštění a zvýšení odolnosti patogenu vůči nepříznivým vlivům (Diggle a kol. 2006; Byrd a kol. 2009). Dále lektiny PAIL a PAIIL narušují funkci epiteliální bariéry dýchacích cest a zvyšují její propustnost pro další virulenční faktory, což opět vede k poškození tkáně během infekce. Lektiny inhibují pohyb řasinek, pravděpodobně přímou vazbou a jejich zesítním, čímž znesnadňují odstranění hlenu a cizorodých částic

včetně bakterií, které jsou v něm zachyceny. Tímto způsobem přispívají k oslabení dalšího obranného mechanismu respiračního traktu (Mewe a kol. 2005).



Obrázek 3: Krystalové struktury komplexů PA-IL-galaktosa, PA-IL-fukosa a PA-IL-manosa – detail vazebných míst lektinů. (a) Tyčinkový model prezentující aminokyseliny a Ca^{2+} ionty podílející se na vazbě sacharidů: koordinační vazby s Ca^{2+} jsou zobrazeny plnou oranžovou čarou a vodíkové vazby přerušovanou zelenou čarou. Barevné označení prvků: červená – kyslík, modrá – dusík, černá – uhlík a růžová – ionty Ca^{2+} . (b) Interakce Ca^{2+} iontů a sacharidů s povrchem proteinu zabarveného dle elektrostatického potenciálu (modrá – nízká hodnota elektronové hustoty přes zelenou až po oranžovou – vysoká hodnota elektronové hustoty). Fialové kuličky znázorňují Ca^{2+} ionty a příslušné sacharidy jsou vyobrazeny pomocí tyčinkového modelu. *Převzato z:* Imberty a kol. 2004

1.3. Rozvoj infekce *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa patří do skupiny oportunních bakterií, které zdravé jedince neohrožují, ale pro CF nemocné je obávaným patogenem. *Pseudomonas aeruginosa* získává potřebnou energii oxidativním metabolismem organických látek jako jsou organické kyseliny, zejména trikarboxylové kyseliny, dále aminokyseliny, ale třeba i glycerol, naopak glukosu využívá jako zdroj energie mnohem méně než jiné bakterie. PA upřednostňuje růst v aerobním či mikroaerobním prostředí, kde je konečným akceptorem elektronů kyslík (aerobní respirace), ale dokáže růst i v anoxických podmínkách, které panují i v CF plicích a při anaerobní respiraci je schopna využívat jako terminální akceptor elektronů dusitany nebo dusičnany (Schobert a Jahn 2010). Díky této metabolické nenáročnosti a variabilitě a dále schopnosti horizontálního přenosu genů je velmi adaptabilním organismem (Klockgether a kol. 2011). Tato vysoká míra adaptability umožňuje bakterii *Pseudomonas aeruginosa* unikat jak před antimikrobiálními látkami, ale také před působením imunitního systému, což komplikuje a zhoršuje průběh infekce (zdravotní stav) u CF nemocných.

Infekce *Pseudomonas aeruginosa* má u pacientů s cystickou fibrosou velmi charakteristický průběh a můžeme ho rozdělit do tří navazujících fází: 1) fáze adheze PA buněk na epitel hostitele, 2) fáze akutní infekce, a 3) fáze chronické infekce. Při počáteční kolonizaci dýchacích cest dochází nejprve k adhezi mikrobiálních buněk na výstelku dýchacích cest, přičemž ještě nevzniká zánět plicní tkáně ani její následná destrukce. V tomto stádiu PA produkuje velké množství virulenčních faktorů (viz kapitola 1.2), které jsou nezbytné pro vznik následné bakteriální infekce. Akutní infekce PA je způsobena nemukoidní formou výskytu patogenu, která je ve srovnání s mukoidní formou PA (způsobující chronickou infekci) citlivější na antibiotika. V tomto případě může být adheze PA k epitelu respiračního traktu přechodná a infekci lze eradikovat vhodnou antimikrobiální terapií. Do jaké míry se infekce rozvine závisí na mnoha faktorech. PA v této fázi infekce produkuje rozmanité spektrum extracelulárních enzymů a toxinů, které poškozují epitelové buňky hostitele. Proti tomu působí imunitní odpověď organismu, produkty zánětlivé reakce či antibiotická léčba ovlivňující chování bakteriálních buněk, které pod vlivem stresových faktorů zahájí expresi genů umožňující jejich adaptaci na nepříznivé podmínky (Furukawa a kol. 2006; Moradali a kol. 2017; Malhotra a kol. 2019). V této fázi dochází k přechodu mikroorganismu PA na mukoidní formu, pro níž je charakteristická tvorba biofilmu a vznik chronické infekce. Alginátový exopolysacharid

umožňuje bakteriím účinnější vazbu k epiteliálním buňkám a zajišťuje efektivní bariéru proti opsonizaci či fagocytose. Současně poskytuje bakteriím vhodnější podmínky pro růst v mikroprostředí s omezeně dostupnými živinami včetně důležitých iontů železa. Bakterie, které jsou součástí biofilmu, a zejména anaerobního biofilmu, jsou rezistentní k exogennímu antimikrobiálnímu působení, především vůči antibiotikům. Odolnost se zvýší oproti planktonnímu výskytu PA (nemukoidní forma) až 1000krát (Harmsen a kol. 2010; Malhotra a kol. 2019; Rasamiravaka a kol. 2015). V této fázi infekce je eradikace patogenu *Pseudomonas aeruginosa* z dýchacích cest CF nemocných už prakticky nemožná.

1.4. Odpověď hostitele na infekci *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je metabolicky všestranná bakterie, která způsobuje u pacientů s CF závažné infekce dýchacích cest spojené s rozvojem zánětu. Závažnost a průběh zánětu u CF nemocných však neodpovídá obvyklé stimulaci zánětu bakteriemi nebo viry u zdravých jedinců, je neúměrně intenzivní a prolongovaný. Příčinou je molekulární defekt CFTR proteinu u pacientů s CF, čímž je modifikována i zánětlivá odpověď organismu na infekční stimuly (Blohmke a kol. 2012; Cohen a Prince 2012). Za nejzávažnější důsledky, které zánět vyvolává, se pokládá poškození epitelu dýchacích cest působením proteolytických enzymů (převážně neutrofilovou elastasou), cytokinů či volných kyslíkových radikálů (ROS) produkovaných buňkami imunitního systému (Vávrová 2006).

Aktivace zánětlivého procesu začíná hromaděním fagocytujících buněk, převážně neutrofilních leukocytů a makrofágů v místě traumatu způsobeném vlivem bakterií. Buňky imunitního systému jsou k místu infekce chemotakticky přitahovány zánětlivými mediátory (chemokiny). Při zánětu dochází ke stimulaci fagocytujících buněk, neutrofilů a makrofágů, která vyvolá produkci volných kyslíkových radikálů způsobujících na buněčné úrovni řadu poškození jako je denaturace strukturních a funkčních proteinů, narušení buněčných lipidových membrán nebo destrukce DNA. Dále makrofágy pacientů s CF produkují podstatně více prozánětlivých cytokinů ve srovnání se zdravými jedinci. V bronchoalveolární laváži pacientů s CF infikovaných PA je významně zvýšená koncentrace prozánětlivých cytokinů jako jsou TNF α , IL-1, IL-6 a IL-8 (využívají se k posouzení míry rozvoje zánětu) (Vávrová 2006). Jak vysoké hladiny těchto cytokinů,

tak i převládající tvorba kyslíkových radikálů nad antioxidačními procesy mají pro hostitele dramatické důsledky, protože dochází k masivnímu poškození jeho epiteliální tkáně. Progrese infekce se projevuje stoupajícím množstvím neutrofilů ve sputu CF nemocných. Neutrofily, které zanikají v místě zánětu, uvolňují do okolí množství proteolytických a dalších enzymů (např. elastasa, lysozym, myeloperoxidasa, katepsiny, kolagenasa, aktivátory komplementu) i jaderné DNA, jejíž vysoká koncentrace přispívá k dalšímu zvýšení viskozity hlenu (Cohen-Cymbarkov a kol. 2013; Watt a kol. 2005). Neméně důležitým faktorem zánětu je i hypoxie, která způsobí, že buňka nemá dostatek energie pro svůj metabolismus a v konečném důsledku vede ke zhroucení mitochondriálních a subcelulárních mechanismů, které vyústí v nekrosu buněk plic. Nekrosa, tedy patologická smrt buňky, je charakterizována neorganizovaným rozpadem buněčných struktur, jejíž produkty jsou opět zdrojem vyvolávajícím další zánětlivou reakci okolní tkáně. Rozpadové produkty epiteliálních buněk spolu s obsahem zaniklých buněk imunitního systému způsobují poškození epitelu, čímž usnadňují další adhezi *Pseudomonas aeruginosa*, podporují růst bakterií což nakonec vyústí v cyklus chronických zánětlivých změn respiračního traktu CF nemocných. Všechny výše popsané zánět podporující procesy jsou v plicích u CF nemocných v převaze nad neadekvátně nízkou protizánětlivou aktivitou, především nedostatečnou produkcí protizánětlivých cytokinů a sníženou činností antiproteas (inhibitorů proteas) či antioxidačního systému (Jakubec 2006).

1.5. Terapeutické přístupy k cystické fibrose

Terapeutické přístupy k CF můžeme podle postižení dýchacího traktu rozdělit do tří kategorií, na ty, které jsou založené na genové terapii, ty, které modulují funkci mutovaného CFTR proteinu, a přístupy ovlivňující bakteriální infekci v dýchacích cestách. Léčba pomocí modulátorů CFTR i antibakteriální terapie potlačují (redukují) klinické projevy a zlepšují celkový zdravotní stav pacienta a jeho kvalitu života, avšak dané onemocnění nevyléčí, zatímco genová terapie je do budoucna slibnou nadějí pro vyléčení cystické fibrosy.

Principem genové léčby je transport funkčních genů (transgenů) do cílových buněk, kde nahradí nebo doplní mutované geny. Transgen je přenesen do buňky pomocí genového vektoru, který může být buď virového (pro CF např. adenoviry, lentiviry,

Sendai virus či lidský parainfluenza virus) či nevirového původu (pro CF např. samotná DNA, nebo s nosiči - kationtové liposomy nebo kationtové polymery) přičemž se může jednat o DNA nebo mRNA přenos (Martini a kol. 2011; Fajac a Wainwright 2017). Předpokladem úspěšné léčby je výběr vhodného vektoru kódujícího CFTR protein, jeho schopnost dostat se do epitelových buněk dýchacího traktu a nevyvolávat imunitní odpověď pacienta (Armstrong a kol. 2014). Slibnou strategií genové terapie je editace (korekce) genetické informace pomocí metody CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), zatím testovanou *in vitro* (De boeck 2020; Maule a kol. 2019). Výhodou těchto přístupů genové terapie CF je jejich možné využití nezávisle na typu mutace CFTR proteinu, který se u pacienta vyskytuje (Griesenbach a kol. 2015). Genová léčba je zatím v klinické praxi pro pacienty stále nedostupná, ale intenzivní výzkum probíhající v tomto oboru je pro nemocné s CF velkou nadějí.

Preparáty, které modulují funkci mutovaného CFTR proteinu, tzv. modulátory, využívá kauzální léčba, která se řídí jednotlivými druhy mutací CFTR, klasifikovanými do sedmi skupin podle toho, jak snižují syntézu, funkci nebo stabilitu CFTR proteinu (De Boeck 2020). První skupinou léků jsou tzv. potenciátory, které zvyšují pravděpodobnost otevření chloridového kanálu a uplatňují se převážně u nositelů mutace G551D a několika dalších z III. třídy mutací CFTR proteinu. Tyto defekty se projevují neschopností NBD domén hydrolyzovat ATP, čímž znemožňují otevření kanálu a transport chloridových iontů. Příkladem již pro pacienty dostupného preparátu je ivacaftor, který prokazatelně zlepšuje funkci plic i pankreatu (Gentzsch a Mall 2018). Dále se mezi modulátory řadí tzv. korektory, které zvyšují množství CFTR proteinů na membráně tak, že ovlivňují skládání CFTR proteinu a jeho následný transport k membráně. Sem patří lumafactor a tezafactor, které v preparátech v kombinaci s ivafactorem jsou určeny pro pacienty s nejběžnější mutací Phe508del (II třída mutací) (De boeck 2020). Další látky ze skupiny modulátorů CFTR kanálu jsou tzv. „read-through“ sloučeniny, které zabraňují předčasnému ukončení translace proteinu CFTR. Mechanismus jejich působení spočívá v překlenutí nepravého, mutací vzniklého terminačního kodonu na mRNA-CFTR, čímž umožňují vznik funkčního proteinu o plné délce. V minulosti byla z této skupiny látek studována aminoglykosidová antibiotika, která však měla řadu vedlejších účinků (vysoká toxicita pro organismus). Po neúspěchu atalurenu, u něhož nebyla prokázána dostatečná účinnost, se zdá být nadějná látka ELX-02, v současnosti testovaná v preklinických studiích (De Boeck 2020; Leubitz a kol. 2019; Fila 2014). Modulátory CFTR proteinu mohou pacientům s běžnými mutacemi jako je Phe508del významně zlepšovat život a

pokud je léčba zahájena v raném dětství, mohou dokonce zabránit závažným komplikacím. Pro pacienty se vzácnějšími mutacemi CFTR je však stále třeba hledat a vyvíjet nové způsoby možné terapie.

Výše zmiňované terapeutické přístupy jsou také komplikovány bakteriálními infekcemi, které jsou součástí typického klinického obrazu CF nemocných a mohou významně snižovat efektivitu aplikovaných léčebných strategií. Velmi důležitou součástí celkové péče je tedy antibakteriální terapie, která nejčastěji využívá širokospektrá antibiotika v dávkování na horní hranici dávkovacího rozmezí a po delší časový interval (minimálně 14 dní až čtyři týdny, často v opakujících se cyklech). V případě léčby infekce *Pseudomonas aeruginosa* se uplatňují inhalačně podávaná antibiotika, např. tobramycin a colistin. Výhoda lokální aplikace spočívá v tom, že antibiotikum je podáváno přímo do místa infekce. V místě působení se léčivo rovnoměrněji distribuuje a jeho lokální koncentrace převyšuje koncentraci dosaženou při systémové aplikaci, přičemž vstřebávání do organismu je nízké s čímž souvisí i jeho menší toxicita. Inhalačním podáním se tedy lze dobře vyhnout rizikům a nevýhodám spojeným se systémovou aplikací (např. intravenózně či orálně) (Vávrová a kol. 2007).

Přes značný pokrok v léčbě antibiotiky v posledních letech však často dochází ke vzniku mikrobiálních rezistencí, které znemožňují úplnou eradikaci patogenu z dýchacích cest a následkem je další zhoršování zdravotního stavu pacientů s CF. To je důvodem, proč je nutné bakteriálním infekcím u CF nemocných předcházet a zaměřit se na profylaktickou péči například pomocí vakcinace.

1.5.1. Aktivní a pasivní imunizace proti *Pseudomonas aeruginosa*

Jeden z možných alternativních přístupů prevence vzniku bakteriální infekce je aktivní nebo pasivní imunizace. Při aktivní imunizaci dochází k rozvoji specifické imunitní odpovědi, produkci neutralizačních protilátek proti určitému antigenu a vytvoření imunitních paměťových buněk, což zajistí dlouhodobou ochranu organismu před infekcí (Jílková 2012). K imunizaci organismu lze využít několik typů vakcín od celobuněčných (inaktivovaný nebo atenuovaný patogen či mikroorganismus s vhodně modifikovaným genomem) přes subjednotkové (rekombinantní), které obsahují jednotlivé imunogenní fragmenty patogenu, až po moderní genové vakcíny obsahující DNA nebo RNA antigenního proteinu, který je syntetizován pomocí proteosyntetického

aparátu buněk imunizovaného jedince a následně vyvolá imunitní odpověď. V případě PA je možné jako vakcinační antigeny využít nejrozmanitější bakteriální virulenní faktory jako povrchové polysacharidy, polysacharid-proteinové konjugáty, lipopolysacharid, bičíky, proteiny vnější membrány nebo pili. V posledních několika desetiletích byla vyvinuta celá řada různých experimentálních vakcín proti *Pseudomonas aeruginosa*, přehled studií lze nalézt například v souhrnných publikacích Merakou a kol. 2018, anebo Priebe a Goldberg 2014, či Döring a Pier 2008. Přestože mnoho z těchto vakcín bylo testováno v preklinických studiích, pouze několik z nich dosáhlo klinických testů a bohužel žádná zatím nezískala povolení k využívání v klinické praxi. V současné době tedy není k dispozici pro pacienty s CF v rámci Evropské unie žádná vakcína proti tomuto patogenu (osobní sdělení tiskového oddělení SÚKL ze dne 30.3.2021). Aktivní imunizace ve většině případů vyvolá tvorbu dostatečného množství (vysoký titr) příslušných protilátek, přesto však nemusí dojít k účinné obraně organismu proti infekci. Snížení efektivity protilátkové odpovědi může být způsobeno mimo jiné i vysokou vrstvou hustého hlenu, která je v dýchacích cestách pacientů s CF přítomna a brání imunoglobulinům dostat se v dostatečném počtu do kontaktu s bakteriálními buňkami (a tím je neutralizovat). V případě již probíhající chronické infekce mukoidní formou PA je to alginátový film, který chrání bakterie před působením protilátek a snižuje tak jejich účinnost (Parad a kol. 1999; Döring a kol. 2007). Aktivní imunizace může být v řadě případů pro organismus pacientů s CF zátěží a je proto důležité neopomíjet ani možnost využití pasivní imunizace.

Pasivní imunizace se stává v poslední době atraktivním terapeutickým přístupem z důvodu zvyšujícího se výskytu rezistentních mikroorganismů na podávaná léčiva (především antibiotika), výskytu nemocí, u nichž pacienti nereagují na léčbu, nebo jedinců se zhoršeným imunitním systémem nereagujících na vakcinaci. Pasivní imunoterapie je tedy vhodná i pro CF nemocné s oslabeným imunitním systémem, kdy vakcinace nevyvolá účinnou imunitní odpověď, ale i pro pacienty s CF s již rozvinutou infekcí (Priebe a Goldberg 2014). Při pasivní imunizaci jsou již hotové protilátky proti patogenu vneseny do organismu, nejlépe přímo do místa působení, v případě pacientů s CF ideálně inhalačním podáním do dýchacích cest. Výhodou tohoto přístupu je, že pacienti získávají odolnost vůči infekci patogeny okamžitě. Díky aktivitě proteolytických enzymů však protilátková ochrana přetrvává pouze po určitou dobu (několik týdnů až čtyři měsíce) což vyžaduje opakované nebo kontinuální podávání protilátek (Kovacs-Nolan a Mine 2012; Baxter 2007).

Na pacientech s CF byly v rámci klinických studií testovány převážně humanizované monoklonální protilátky třídy IgG (podtřídy 1). Jako antigeny byly využívány virulenční faktory PA, nejvíce protein PcrV, který je sekretován po kontaktu patogenu s hostitelskou buňkou bakteriálním sekrečním systémem III. Jedná se o „hrotový“ (needle-tip) protein, který vytváří póry v membráně hostitelských buněk a umožňuje tak průchod dalších efektorových proteinů do eukaryotické buňky, což v konečném důsledku vede k její intoxikaci. Dalšími vhodnými antigeny jsou sekretované bakteriální exopolysacharidy Psl a alginát, které jsou součástí bakteriálního biofilmu. Pentasacharid Psl se podílí (spolu s Pel polysacharidem) na tvorbě ranných stádií biofilmu u nemukoidních kmenů PA a polysacharidový alginát je součástí matrice biofilmu mukoidních forem PA, oba polymery se liší svým sacharidovým složením (Powell a kol 2018). Hlavní funkcí obou polysacharidů v kontextu s virulencí patogenu je ochrana proti opsonizaci a fagocytose neutrofily a makrofágy. Vakcína (MEDI3902) humanizované bispecifické protilátky cílené proti těmto virulenčním faktorům (Psl a PcrV) tedy zvyšuje „uptake“ PA buňkami imunitního systému, ale také inhibuje funkci bakteriálního sekrečního systému III. (Merakou a kol. 2018). Významnou výhodou těchto zmíněných cílů vakcinačních protilátek je, že se jedná o velmi konzervované struktury v genomu PA, nezávislé na sérotypu *Pseudomonas aeruginosa*. Intaktní PcrV i Psl operon byl nalezen u 94 % a 99 % klinických izolátů PA zachycených po celém světě, což významně snižuje riziko úniku PA před účinkem aplikovaných vakcín (Tabor a kol. 2018).

Vlastnosti protilátek pro pasivní imunizaci lze upravovat tak, aby lépe vyhovovaly potřebám pacientů a požadavkům na vakcínu. Příkladem je delece nežádoucí domény nebo celého tzv. Fc fragmentu (crystallizable) imunoglobulinu IgG (podrobněji o struktuře protilátek viz kapitola 1.5.2.). Pro profylaxi je pak možné využít pouze Fab fragment (**antigen binding**), který obsahuje epitop interagující s příslušným antigenem, a tím minimalizovat nežádoucí imunitní odpověď, kterou Fc fragment IgG může vyvolávat (Merakou a kol. 2018).

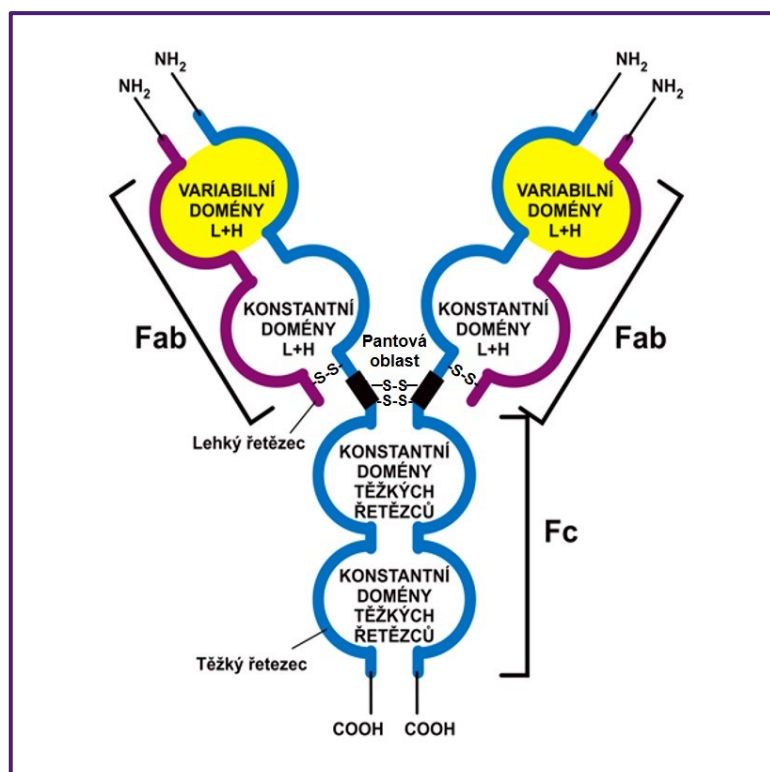
Preparáty pro pasivní imunizaci proti PA, založené na výše zmiňovaných principech, byly či jsou v různých stádiích klinického testování, avšak stejně jako v případě vakcín určených pro aktivní imunizaci, žádná zatím nedosáhla schválení pro použití v klinické praxi.

Zajímavou alternativou k humanizovaným či jinak upraveným savčím protilátkám jsou ptačí žloutkové imunoglobuliny IgY, jež byly jako prostředky pasivní

imunizace úspěšně použity k eradikaci některých infekčních onemocnění u zvířat (Xu a kol. 2011). Povzbudivé jsou i výsledky klinických studií zaměřených na účinnost imunoterapie IgY protilátkami při prevenci gastrointestinálních infekcí (Rahman a kol. 2012) nebo kolonizace PA u CF nemocných (Nilsson a kol. 2008; Merakou a kol. 2018).

1.5.2. Struktura imunoglobulinů IgY a IgG

Typická struktura molekuly imunoglobulinu je tvořena ze dvou těžkých (H) a dvou lehkých řetězců (L). Disulfidické můstky spojují k sobě vzájemně jednak oba těžké řetězce a dále ke každému H řetězci připojují jeden L řetězec. Těžké řetězce se skládají ze čtyř až pěti (v závislosti na imunoglobulinové třídě) strukturně podobných domén, svojí strukturou připomínajících soudek, které jsou vzájemně spojené krátkými úseky peptidového řetězce (viz obr. 4, str. 37). Lehké řetězce jsou tvořeny pouze dvěma doménami. N-koncová část těžkého a lehkého řetězce se označuje jako tzv. variabilní oblast (V_H , resp. V_L) a vytváří vazebné místo pro antigen. Rozdíly ve struktuře variabilní domény imunoglobulinů umožňují jejich obrovskou vazebnou rozmanitost. Individuálně se imunoglobuliny liší v závislosti na klonu B lymfocytů, který je produkuje. Ostatní domény molekuly se označují jako konstantní (C_H , resp. C_L), podle příslušnosti k těžkému nebo lehkému řetězci.



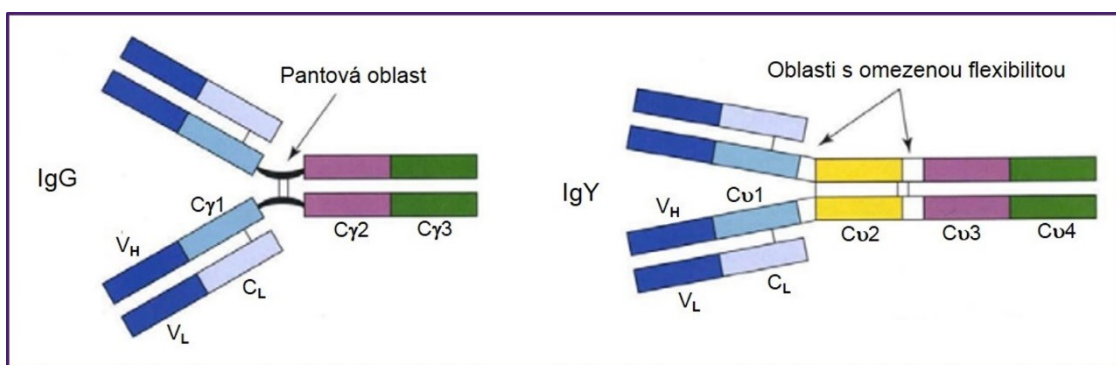
Obrázek 4: Struktura monomeru imunoglobulinu. Fab – fragment imunoglobulinu (antigen binding), Fc – fragment imunoglobulinu (crystallizable), L – lehký řetězec, H – těžký řetězec. Převzato a upraveno z: webový zdroj č. 3.

Molekulu imunoglobulinu lze proteolyticky štěpit na jednotlivé fragmenty Fab (antigen binding), Fc (crystallizable) a popř. Fv (variable). Fab fragment obsahuje variabilní oblast a je tedy schopen vázat antigen, zatímco Fc fragment je zodpovědný za efektorové funkce imunoglobulinů, rozpoznává Fc receptor fagocytů či komplementový protein C1. Menší Fv fragment je částí Fab fragmentu a skládá se z nekovalentně asociovaných N-koncových domén variabilní oblasti H a L řetězce. Oblast spojující oba těžké řetězce pomocí disulfidických můstků se nazývá jako tzv. pantová oblast a poskytuje určitou flexibilitu Fab fragmentům, což umožňuje bifukčnost těchto protilátek (např. u IgG), (Hořejší a kol. 2017).

V lidském organismu existuje pět typů těžkých řetězců μ , δ , γ , α a ϵ , podle kterých se rozdělují imunoglobuliny do jednotlivých tříd IgM, IgD, IgG, IgA a IgE. U některých tříd Ig rozeznáváme ještě subtypy řetězců. Lehké řetězce mají pouze dva typy řetězců κ a λ (Hořejší a kol. 2017). V přirozené molekule Ig jsou vždy dva totožné těžké a dva totožné lehké řetězce. Jednotlivé třídy imunoglobulinů se liší podle počtu monomerů, od monomerního IgG až po pentamer IgM (např. u lidí). Rozdíly nacházíme

nejen ve strukturním uspořádání jednotlivých Ig, ale s ním souvisejících biochemických vlastnostech, imunochemických reakcích, kterých se účastní, a v mnoha dalších aspektech.

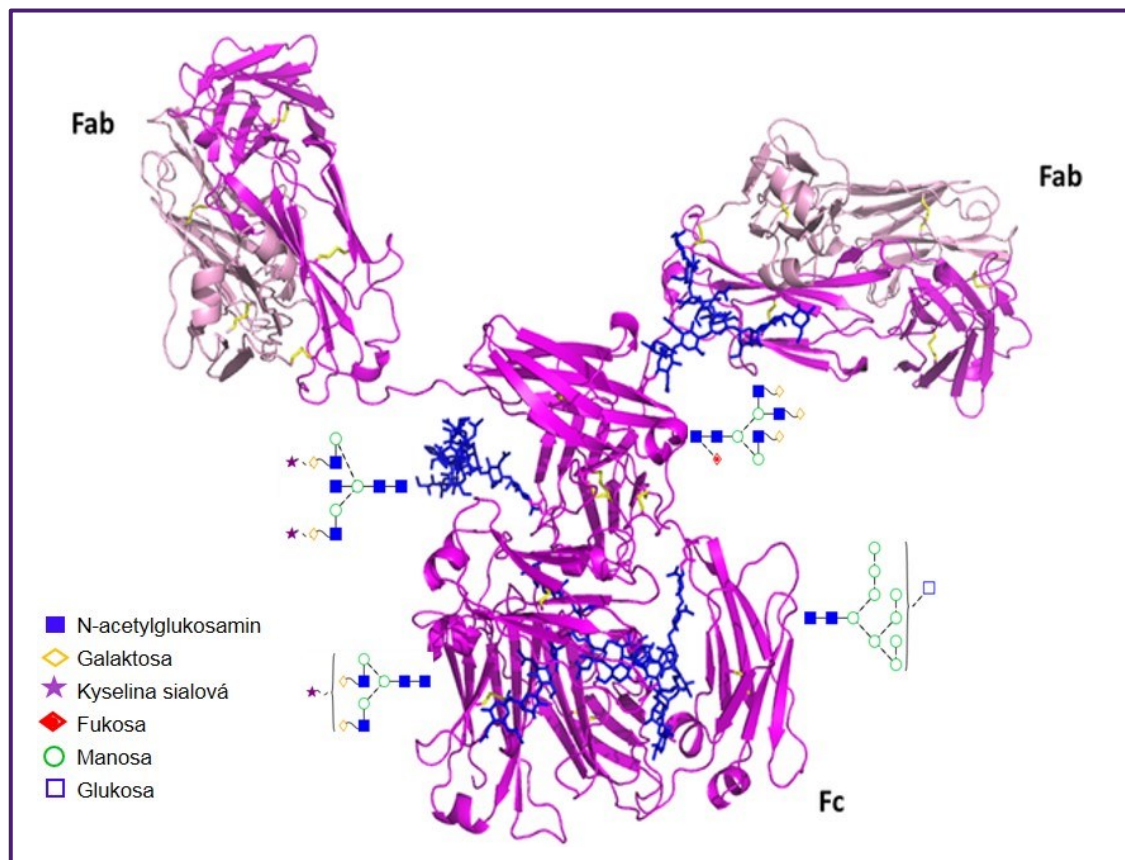
IgY je převládající sérový imunoglobulin u ptáků, plazů a obojživelníků a je považován za evolučního předka savčích protilátek třídy IgG a především IgE (Narat, M. 2003). Přestože oba imunoglobuliny, IgY a IgG, mají podobné vlastnosti i funkci v organismu, existují mezi nimi významné strukturní rozdíly. První odlišností je počet konstantních domén těžkého řetězce, IgY obsahuje čtyři domény ($C_{H1} - C_{H4}$) oproti třem u IgG, což má za následek vyšší molekulovou hmotnost IgY (180 kDa vs. 150 kDa) (Gilgunn a kol. 2016). Kromě toho IgY postrádá „pantovou oblast“, což snižuje flexibilitu obou ramen Fab fragmentů IgY. Určitá omezená míra flexibility IgY je dána oblastmi bohatými na prolin a glycin v částech proteinového řetězce mezi doménami $C_{H1}-C_{H2}$ a $C_{H2}-C_{H3}$ (viz obr. 5). U IgG pantová oblast umožňuje ohyb krátkých ramének v úhlu $60 - 180^\circ$ a stericky usnadňuje spojení vazebného epitopu protilátky s antigenem. (Štern 2016)



Obrázek 5: Srovnání struktury ptačího IgY a savčího IgG. V_H – variabilní doména těžkého řetězce, V_L – variabilní doména lehkého řetězce, C_L – konstantní doména lehkého řetězce, $C_{\gamma 1}$, $C_{\gamma 2}$, $C_{\gamma 3}$ – konstantní domény 1, 2, 3 těžkého řetězce γ , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , C_{H4} – konstantní domény 1, 2, 3, 4 těžkého řetězce γ . Převzato a upraveno z: Warr a kol. 1995

Jak již bylo zmíněno, další rozdíl mezi oběma typy imunoglobulinů je také v jejich glykosylaci. Obsah a typ oligosacharidů v terapeutických imunoglobulinech hraje významnou roli v jejich biologické aktivitě a farmakokinetice. IgY je více glykosylovaný, obsahuje dvě glykosylační místa na doméně C_{H2} (Asn308) a C_{H3} (Asn407), kdežto IgG disponuje pouze jedním místem na doméně C_{H2} (Asn297) (Zhang a kol. 2017; Suzuki a Lee 2004). Oba imunoglobuliny obsahují N-glykosidicky vázané glykany, liší se však typem, zastoupením a sacharidovým složením. Strukturní analýza provedená Gilgunn (2016) odhalila, že slepičí sérové polyklonální IgY obsahují všechny tři typy N-

glykosidicky vázaných glykanů. Převažují komplexní glykany s dvěma až čtyřmi „anténami“ a s různou úrovní galaktosylace a sialylace, dále hybridní glykany i glykany s vysokým obsahem manosy (viz obr. 6). Zastoupení sacharidových řetězců s vysokým obsahem manosy je však ve srovnání s množstvím sialovaných komplexních glykanů u IgY poměrně nízké a nemělo by tak ovlivnit jejich terapeutické působení. (Gilgunn a kol. 2016). Glykosylační profil potenciálních imunoglobulinových terapeutik je druhově specifický a je silně ovlivněn použitými buněčnými liniemi a podmínkami při produkci imunoglobulinů. Znalost sacharidových struktur, přítomných na Ig molekulách, je tedy pro jejich možné využití nezbytná, neboť mohou významně ovlivňovat fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti těchto potenciálních terapeutik.



Obrázek 6: Model glykosylované molekuly IgY (purpurová – těžké řetězce, růžová – lehké řetězce, žlutá – disulfidové můstky, modrá – sacharidové řetězce). Převzato a upraveno z: Gilgunn a kol. 2016

1.5.3. Funkční srovnání savčích a ptačích imunoglobulinů

Slepičí vejce jsou již dlouho uznávaným zdrojem živin včetně velkého množství protilátek, které chrání vyvíjející se embryo. U slepic nacházíme v závislosti na typu těžkého řetězce (podrobněji viz. kapitola 1.5.2) celkem tři třídy imunoglobulinů, IgA, IgM a IgY. Ptačí imunoglobuliny IgA a IgM jsou funkčním ekvivalentem savčích protilátek se stejným označením a IgY odpovídají savčím imunoglobulinům třídy G. U slepic jsou imunoglobulinové protilátky produkovány B lymfocyty v primárním lymfatickém orgánu ptáků tzv. Fabriciově burze. Během tvorby vajíčka se IgY ze séra přenáší do vaječného žloutku a IgA s IgM jsou ukládány do bílku. Koncentrace IgA i IgM v bílku jsou relativně nízké ($\sim 0,7 \text{ mg.ml}^{-1}$ respektive $\sim 0,15 \text{ mg.ml}^{-1}$) ve srovnání s obsahem IgY ve vaječném žloutku ($8\text{--}25 \text{ mg.ml}^{-1}$) (Chalghoumi a kol. 2012). Po vylíhnutí pak distribuce imunoglobulinů v organismu kuřat odráží jejich různé role v imunitní obraně jedince (Tizard 2002; Kovacs-Nolan a Mine 2012).

Ptačí IgY mohou na patogen působit třemi způsoby, neutralizací (tj. zablokování funkce), opsonizací a aglutinací. Na rozdíl od některých savčích imunoglobulinů, IgY neaktivují komplement savců. Hlavním efektorovým mechanismem účinku IgY je neutralizace, kdy protilátka blokuje mikroorganismus vazbou na kritický epitop, nutný pro adhezi bakterie k epiteliálním buňkám hostitele a inaktivuje mikrobiální toxiny. (Hořejší a kol. 2017; Abbas a kol. 2019). Bylo zjištěno, že IgY interaguje s virulencními faktory na povrchu gramnegativních bakterií, včetně PA, jako jsou pili, bičíky, lipopolysacharidy, anebo proteiny vnější bakteriální membrány jako např. lektiny. (Xu a kol. 2011). Náš výzkum se zaměřil na testování schopnosti slepičích protilátek proti bakteriálnímu lektinu *Pseudomonas aeruginosa* PAIIL inhibovat adhezi PA na buňky plicních linií pacienta s CF (CuFi) a zdravého jedince (NuLi). V obou případech došlo k účinné redukci adheze PA na lidské plicní epiteliální buňky, v případě CuFi buněčných linií, které byly k adhezi PA vnímavější, bylo detekováno až 50% snížení, (podrobněji viz kapitola 3.2.; Nosková a kol. 2015).

Ptačí IgY také mohou patogenní buňky opsonizovat a tím moderovat fagocytární aktivitu makrofágů a polymorfonukleárních neutrofilních buněk (PMN) vedoucí až k degradaci patogenu. Opsonizace PA bakteriálních buněk antiPA-IgY protilátkami zvýšila míru oxidativního vzplanutí a následně usmrcení bakterií fagocytosou pozorované v *in vitro* studii na purifikovaných lidských PMN. Redukce životaschopných PA bakterií byla v tomto případě až 87% (Thomsen a kol. 2015).

Aglutinace bakterií je spíše vedlejší efekt působení IgY, který navrhuje Tsobokura a kol. (1997) jako možný mechanismus působení terapie IgY proti *Campylobacter jejuni* u kuřat. Zesíťování bakterií vedlo ke snížení jejich celkového množství (CFU) ve střevním traktu kuřat zřejmě tím, že usnadnilo jejich eliminaci ze střev, nikoliv prostřednictvím přímých účinků na jednotlivé bakteriální buňky mechanismem neutralizace a opsonizace. Tento jev zesíťování bakteriálních buněk pomocí IgY může probíhat spíše přes glykosylovanou Fc část protilátky, která interaguje s lektiny na povrchu bakterií (ústní sdělení Hodek 2014), než přes obě vazebná místa pro antigen. Důvodem je omezená flexibilita obou ramen IgY protilátky v důsledku chybějící „pantové oblasti“ známé ze struktury IgG (Yongping a kol. 2011).

1.5.4. Výhody slepičích žloutkových imunoglobulinů IgY

V poslední době se k využití slepičích IgY jako prostředku pro prevenci některých infekcí obrací více pozornosti, protože mají ve srovnání se savčími IgG celou řadu výhod. Sérový imunoglobulin IgY slepice ukládá ve velkém množství do vaječného žloutku (cca 100 mg IgY/vajíčko) k ochraně vyvíjejícího se embrya před potenciálními patogeny (Janson a kol. 1994; Kovacs-Nolan a kol. 2012). Imunizací slepice vhodným imunogenem je tedy možné vyvolat produkci specifických protilátek proti patogenům vyvolávajícím nežádoucí infekce, které lze využít pro pasivní imunizaci v humánní i veterinární medicíně.

Jedním z nejdůležitějších požadavků, které musí prostředek pasivní imunizace splňovat, je její bezpečnost, tedy aby její komponenty nevyvolávaly u příjemce negativní imunitní nebo zánětlivou odpověď. Jak bylo naznačeno výše, savčí imunoglobuliny IgG obsahují Fc fragment, který pomocí domény CH_2 aktivuje po vazbě antigenu kaskádovou reakci komplementu a dále spolu s CH_3 doménou zajišťuje interakci IgG s Fc receptory fagocytů a stimuluje fagocytosu (Hořejší a kol. 2017). Oproti tomu Fc fragment ptačích imunoglobulinů IgY s Fc receptory lidských imunitních buněk ani se složkami komplementu neinteraguje, čímž nedochází ke spuštění potenciálně nebezpečné imunitní reakce (Carlander a kol. 2000). Potvrzení, že ptačí IgY nevyvolávají zánětlivé reakce, bylo součástí i této práce a získané výsledky jsou prezentovány v publikaci Kubičková a kol. 2014. Obsahem pilotních experimentů bylo testování vlivu ptačích IgY ve srovnání s lidským IgG a kozím IgG na tvorbu prozánětlivých faktorů v plicních buněčných

liniích, přičemž jako pozitivní kontrola byl zvolen silně aktivní lipopolysacharid bakteriální stěny LPS. Bylo prokázáno, že hladiny cytokinů TNF- α , IL-1 β , IL-6 a GM-CSF byly v buněčných kulturách exponovaných ptačím IgY nízké vzhledem k vysokým hladinám zejména TNF α a GM-CSF v buněčných kulturách vystavených LPS. Výsledek tedy naznačuje, že na úrovni plicních buněčných linií IgY zánětlivé reakce nevyvolávají. Studie provedená v naší laboratoři (Hadrabová a kol. 2015) tento závěr potvrdila i na úrovni experimentálních zvířat, kterým byl imunoglobulin IgY podáván inhalačně. Potkani denně po dobu 28 dnů inhalovali buď IgY, Fab fragment IgY, ovalbumin, nebo jen PBS a následně byla provedena komplexní analýza odebraného séra, tekutiny z bronchoalveolární laváže (BAL) a plic s ohledem na přítomnost prozánětlivých markerů a patologické změny tkáně. Lze shrnout, že inhalace IgY způsobila mírný nárůst pouze u faktorů GRO/KC a TNF- α v BAL oproti negativní kontrole exponované pouze PBS, hladiny všech ostatních sledovaných prozánětlivých cytokinů ovlivněny nebyly. U experimentálních zvířat vystavených ovalbuminu byl pozorován nárůst cytokinu GM-CSF v séru, marginální zvýšení koncentrace cytokinů TNF- α a GRO/KC v BAL a minimální histologické změny plicní tkáně.

Ptačí IgY získávané ze žloutku jsou výhodné i z hlediska produkce a skladování. Ve srovnání se sérem savců, vaječný žloutek obsahuje z ptačích imunoglobulinů pouze IgY, což výrazně usnadňuje izolaci požadovaných imunoglobulinů (Gassmann a kol. 1990). Navíc IgY lze ze směsi ostatních žloutkových proteinů izolovat jednoduchou a ekonomicky nenáročnou metodou (Hodek a kol. 2013). Co do množství protilátek, slepice za jeden rok může vyprodukovat cca 22 g IgY, přičemž 2 až 10 % obsahu těchto IgY jsou antigenně specifické protilátky, což překračuje roční produkci IgG čtyř králíků (Abbas a kol. 2019; Li a kol. 2015). Neměla by se opomíjet ani míra invazivity při odběru materiálu pro získávání protilátek, kdy sběr vajec je pro slepice mnohem méně stresující ve srovnání s odběrem krve savců.

Ptačí IgY lze skladovat po různá časová období v závislosti na teplotním režimu. Při 37 °C si udrží IgY svoji aktivitu po dobu 1 měsíce, při pokojové teplotě je to až 6 měsíců. Při 4 °C je lze uchovávat bez významné ztráty aktivity 5-10 let. Dlouhodobě je možné IgY skladovat i při -20 °C, ale uchování při -70 °C může způsobit až 50 % ztrátu aktivity (Abbas a kol. 2019). Předpokladem úspěšného skladování IgY v roztoku je také přídavek konzervantu, např. azidu sodného v koncentraci 0,02 % (w/v) nebo thimerosalu v koncentraci 0,03 % (w/v) či 50 µg/ml gentamicinu (Schade a kol. 2005). Své výhody

má i lyofilizace IgY, neboť zabraňuje růstu bakterií a napomáhá k udržení strukturní integrity purifikovaných protilátek. IgY jsou stabilní i v poměrně širokém rozmezí hodnot pH 4 až 11. Při nižším pH než 4 klesá aktivita díky konformačním změnám v místě vázajícím antigen (Abbas a kol. 2019).

Zajímavým a neméně důležitým parametrem při srovnávání IgY a IgG je i jejich avidita, tedy síla interakce polyvalentní protilátky s polyvalentním antigenem. Avidita vzrůstá s afinitou interakce jednoho vazebného místa ale také s počtem těchto simultánně se uplatňujících vazebných míst (Hořejší a kol. 2017). Avidita se liší v závislosti na typu protilátky i antigenu. Ve studii provedené Ikemori a kol. (1993) byla testována avidita IgY (slepice) ve srovnání s IgG (krav) proti fimbriím enterotoxigenní *Escherichia coli*. Výsledky dokazují, že v případě totožného antigenu došlo u slepic k produkci IgY s významně vyšší aviditou k tomuto antigenu, než měl sérový imunoglobulin IgG produkovaný skotem. Silná avidita IgY k fimbriím *E. coli* může vysvětlovat jejich vysokou účinnost proti infekčním střevním chorobám u zvířat způsobených tímto patogenem.

Při posuzování IgY jako možného terapeutického prostředku je také velmi důležitá farmakokinetika a biologický poločas protilátky v organismu, který je v případě protilátek ovlivněn i jejich glykosylací. IgY je ve srovnání s imunoglobulinem IgG savců více glykosylovaný a navíc obsahuje komplexní glykany, které jsou vysoce sialované. Vysoký obsah kyseliny sialové může významně prodloužit dobu působení v organismu pacienta jako se to děje v případě i jiných sialovaných terapeutik (Gilgunn a kol. 2015). Naopak vysoký obsah manosy v glykanech na Fc fragmentu imunoglobulinu může zvyšovat jeho „clearance“, jak bylo pozorováno v případě terapeutické protilátky IgG v lidském séru (Goetze a kol. 2011; Liu 2015).

1.6. Experimentální modely pro studium cystické fibrosy

Pro studium podstaty onemocnění CF a následně testování terapeutických možností je třeba mít k dispozici vhodné experimentální zvířecí modely. Největší skupinu experimentálních modelů představují myší modely, ale uplatňují se i potkani, fretky, ovce, sladkovodní ryba *Danio rerio* (Zebrafish), anebo prasata. Protože je cystická fibrosa multiorgánové postižení, navržené zvířecí modely dokáží manifestovat klinické aspekty tohoto onemocnění projevujícího se u lidí jen do omezené míry. Důvodem jsou

především anatomické a fyziologické rozdíly mezi modelovými organismy a člověkem. Také samotný CFTR protein jednotlivých živočišných druhů a člověka se ve své aminokyselinové sekvenční homologii v různé míře liší (viz tabulka 1) (Semaniakou a kol. 2019).

Tabulka 1: Srovnání aminokyselinové homologie CFTR proteinu jednotlivých zvířecích druhů a člověka. *Převzato a upraveno z: Semaniakou a kol. 2019*

Zvířecí druh	Homologie [%]
myš	78
prase	93
fretka	92
potkan	76
ovce	91
<i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	55

V průběhu posledních 25 let bylo vytvořeno několik typů myších modelů CF. Z počátku se jednalo o tzv. „knock-out“ modely, které zcela vyřadí *CFTR* gen z funkce nebo tzv. „knock-down“ modely, které pouze utlumí expresi tohoto genu. Dále byly testovány myší modely se specifickými mutacemi genu *CFTR*, typickými pro cystickou fibrosu u člověka, jako jsou Phe580del, G480C anebo G551D. Genetická modifikace u většiny zmíněných modelových systémů způsobila snížený či nulový průtok chloridových iontů CFTR kanálem (Scholte a kol. 2004; Semaniakou a kol. 2019), avšak k narušení homeostáze iontů v buňce tak, jako se to děje u pacientů s CF, přesto nedošlo. Důvodem je přítomnost dalšího chloridového kanálu CACC, který například u myší majoritně zajišťuje transport chloridových iontů přes membránu buňky a zcela kompenzuje, vlivem modelové mutace, nefunkční CFTR kanál (Rock a kol. 2009). Tento Ca^{2+} ionty aktivovaný kanál je nezbytný pro udržení správné hladiny ASL v dýchacích cestách myší, čímž významně přispívá k obraně organismu proti patogenům. To může být jedna z příčin, proč u testovaných myších modelů nedochází spontánně ke vzniku a následně rozvoji bakteriální infekce (například *Pseudomonas aeruginosa*). Navození akutní pneumonie je možné provést intratracheální instilací bakteriální suspenze. Ani samotná aplikace patogenu přímo do dýchacích cest však nevede k nastolení chronické infekce, dochází buď k rychlému odstranění bakterií z dýchacích cest nebo naopak k sepsi následované smrtí experimentálního zvířete (Guilbault a kol. 2007). K rozvoji

chronické infekce PA trvající delší dobu (více než měsíc) je třeba upravit bakteriální suspenzi tak, aby bakteriální buňky byly chráněny před imunitní reakcí hostitele. To lze provést například uzavřením bakteriálních buněk do agarových, agarosových nebo alginátových kuliček, které mají napodobit podmínky výskytu mukoidní formy PA v biofilmu, jež se vyskytuje u nemocných CF s chronickou infekcí (Semaniakou a kol. 2019). U některých myších modelů chronické plicní infekce tento postup vyvolal zhoršení mukociliární „clearance“, dlouhodobou infekci (dva až tři týdny) i zánět dýchacích cest s patologickými změnami plicní tkáně modelových myší (Bragonzi a kol. 2010; van Heeckeren a Schluchter 2002). Na druhou stranu, nevýhodou většiny myších CF modelů s geneticky modifikovaným CFTR kanálem jsou typické střevní obstrukce, které se spontánně vyvíjejí a významně zvyšují mortalitu experimentálních zvířat (Keiser a Engelhardt, 2011). Hledání nových alternativních přístupů k vytvoření vhodného modelového systému pro studium CF je velmi důležité a je součástí i této práce. Podstatou námi navrženého myšího modelu bez genetické modifikace je úprava pouze povrchu epitelu dýchacích cest tak, aby mimikoval situaci u nemocných CF (podrobněji viz kapitola 3.4).

Mezi další experimentální zvířata využívaná ke studiu CF patří prasata, neboť mají podobnou anatomii a morfologii plic jako lidé (Welsh a kol. 2009). Z genetických modifikací se zkoušejí převážně *Cftr*^{-/-} anebo *Cftr*^{F508del/F508del} modely, přičemž novorozená selata nevykazují (stejně jako lidé) známky zánětu plic ale na rozdíl od myších modelů u nich dochází během postnatálního vývoje ke vzniku spontánní bakteriální infekce, která následně vyvolává zánět plic (Wine 2010). U starších prasat s delecí fenylalaninu v pozici 508 CFTR proteinu byla pozorována pouze zbytková funkce CFTR kanálu (cca 6% ve srovnání s kontrolními jedinci) (Ostedgaard a kol. 2011). Přestože se u prasat dobře manifestují velmi podobné klinické příznaky CF v dýchacím traktu jako u lidí, je obtížné udržet novorozená selata dostatečně dlouhou dobu naživu. Geneticky modifikovaná selata, obdobně jako myši, trpí ve většině případů střevními komplikacemi, převážně mekoniovým ileem, který pokud není řešen chirurgicky, způsobuje 100% úmrtnost selat a znemožňuje tak dlouhodobé studium rozvoje CF (Welsh a kol. 2009).

Modelovými zvířaty s patogenezí plic srovnatelnou s pacienty s CF jsou i geneticky modifikované fretky, anebo ovce. Fretky navíc společně se sladkovodní rybou *Danio rerio* sdílejí mnoho společných rysů onemocnění slinivky břišní s jedinci trpícími CF a jsou slibným modelem pro studium projevů pankreatické insuficience a

testování potenciálních terapeutických možností. U potkanů, obdobně jako v případě myších modelů, nedochází ke spontánnímu rozvoji bakteriální infekce plic ani onemocnění slinivky břišní, ale jeví se jako výhodný nástroj pro zkoumání růstu kostí v souvislosti s projevy CF. Závěrem lze shrnout, že většina zmiňovaných zvířecích modelů CF, připravených genetickou modifikací, trpí v různé míře obstrukcemi střev, což velmi komplikuje dlouhodobější přežití zvířat a možnost sledování progresu onemocnění CF.

2. Cíle disertační práce

Disertační práce se zaměřuje na studium možného využití slepičích protilátek IgY jako alternativního terapeutického prostředku k prevenci infekcí plic způsobených oportunním patogenem *Pseudomonas aeruginosa* u pacientů s cystickou fibrosou. Pro splnění tohoto cíle, bylo třeba řešit následující dílčí úkoly:

- Studovat případné prozánětlivé vlastnosti slepičích žloutkových protilátek IgY na základě produkce cytokinů liniemi lidských plicních buněk.
- Vyvinout experimentální testovací systém pro analýzu vlivu protilátek IgY na míru adherence patogenu *Pseudomonas aeruginosa* k plicním epitelialním buňkám.
- S využitím testovacího systému ověřit profylaktický potenciál slepičích protilátek IgY připravených proti bakteriálnímu virelenčnímu faktoru, lektinu PAIIL, který hraje rozhodující roli v patogenesi u pacientů s CF.
- Vyvinout vhodný experimentální zvířecí model napodobující podmínky v respiračním traktu nemocných s CF pro studium prevence infekcí způsobených *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Výsledková část

Předkládaná disertační práce se věnuje přípravě myšího modelu pro studium cystické fibrosy a jeho využití pro testování slepičích protilátek IgY jako profylaktického prostředku proti infekcím podmíněným patogenem *Pseudomonas aeruginosa*, které jsou pro pacienty s CF typické a ve svých důsledcích život ohrožující. V první části práce (kapitola 3.1.) jsme se zaměřili na přípravu slepičích žloutkových protilátek a následné ověření bezpečnosti jejich aplikace na epitel plic. Zásadní podmínkou uvažovaného terapeutického využití IgY je to, že v plicích pacientů s CF nenavodí zánětlivé reakce. Na modelovém systému plicních buněčných linií bylo proto sledováno, zda IgY ovlivní produkci zánětlivých cytokinů. Další část práce (kapitola 3.2.) je věnována vývoji tzv. adhezního testu pro stanovení míry vazby bakterií PA na plicní epitelální buňky. Tento test byl klíčový pro průkaz profylaktického účinku protilátek IgY na infekci *Pseudomonas aeruginosa*. Ve třetí části práce (kapitola 3.3.) byla detailně studována schopnost polyklonálních protilátek IgY cílených proti bakteriálnímu lektinu PAIIL zabránit vazbě patogenu PA na buněčné linie plicního epitelu zdravého a CF nemocného jedince (linie označené CuFi a NuLi). V závěrečné části práce (kapitola 3.4.) bylo naším cílem vyvinout *in vivo* model pro studium CF bez nutnosti genetické modifikace spojené s mnohými nevýhodami, který by dobře mimikoval podmínky v dýchacím traktu pacientů s CF. Jako experimentální model byl zvolen „outbrední“ kmen ICR CD1 myši, jimž byl pomocí enzymu neuraminidasy upraven povrch epitelu dýchacího traktu. Takto ošetřené myši byly následně exponovány bakteriím PA a byl sledován vliv působení enzymu na míru adheze patogenu.

3.1. Přiložená publikace č. 1

Effect of chicken antibodies on inflammation in human lung epithelial cell lines

Božena Kubíčková, Barbora Majerová, Jana Hadrabová, Libuše Nosková, Marie Stiborová, Petr Hodek

Neuroendocrinology Letters, 35 (Suppl. 2), 99-104 (2014), IF=0,799

Podíl disertantky na prezentované publikaci: Participace na plánování experimentů, účast na charakterizaci slepičích protilátek IgY, práce s buněčnými liniemi, vyhodnocení experimentálních dat a jejich statistické zpracování, sepsování publikace.

Slepičí protilátky IgY jsou zkoumány jako možný nástroj pro orální imunoprophylaxi i jako lék pro terapii infekčních onemocnění. Příkladem je využití IgY pro imunoprophylaxi či léčbu průjemových infekcí u hospodářských zvířat způsobených např. bovinním koronavirem nebo enterotoxigenní *E. coli*. (da Silva a kol. 2010). IgY proti *Pseudomonas aeruginosa* byly v rámci klinické studie testovány jako prostředek pro prevenci reinfekce PA také na lidech (pacientech s CF) ve formě roztoku ke kloktání (Schuster a kol. 2019).

Cílem této práce bylo zjistit, jaký vliv mají slepičí protilátky IgY na plicní epiteliální buňky s ohledem na rozvoj zánětu. Pro studium vlivu slepičích imunoglobulinů na produkci zánětlivých cytokinů byly porovnávány kromě IgY, také Fab fragment IgY, savčí IgG a ovalbumin. Fab fragment byl do expozičních testů zahrnut z důvodu posouzení, zdali tato část IgY molekuly bez glykosylované části bude vhodnější (ve srovnání s celou molekulou IgY) z hlediska menšího rizika vyvolání nežádoucích zánětlivých reakcí a ovalbumin byl testován jako možná kontaminanta IgY frakcí.

Příprava IgY z komerčně dostupných vajec probíhala ve dvou krocích podle protokolu Hodek a kol. (2013) zahrnujících extrakci proteinů vaječných žloutků do vody (ředění, zmrazení a filtrace) a následnou specifickou precipitaci IgY chloridem sodným. Část získaného materiálu byla podrobena proteolytickému štěpení papainem podle Akita a kol. (1993) a Bereli a kol. (2005) pro přípravu Fab fragmentu vázajícího antigen. Produkty štěpení IgY, fragmenty Fab (o molekulové hmotnosti 44 kDa) a Fc (55 kDa), byly separovány pomocí ionexové chromatografie s využitím slabého anexu DEAE-Sephacel. Pomocí SDS-PAGE byly preparáty identifikovány a ověřena jejich čistota (viz obr. 2 publikace č. 1, str. 58). Expoziční testy pro sledování vlivu slepičích IgY na produkci cytokinů byly prováděny na třech typech buněčných linií: 1) NuLi – imortalizované buňky izolované z plic zdravého 36letého muže, 2) CuFi – imortalizované buňky plic 36leté pacientky trpící cystickou fibrosou, a 3) A549 – buněčná linie odvozená z plicního adenokarcinomu 58letého pacienta. Buněčné linie byly vystaveny po dobu 24 hodin slepičím IgY, Fab fragmentům IgY a pro srovnání savčím imunoglobulinům (lidský a kozí IgG) ve shodné koncentraci (1 mg/ml). Do expozičních experimentů byl zahrnut též ovalbumin (1 mg/ml) jako možná kontaminanta IgY frakce, bakteriální LPS (80 µg/ml) jako pozitivní kontrola, neboť vyvolává produkci cytokinů (Hansen a kol. 1999), a PBS jako negativní kontrola. Následně byly v buněčných médiích stanoveny koncentrace cytokinů TNF- α , IL-1 β , IL-6 a GM-CSF pomocí metody BioPlex, která umožňuje určit typ i koncentraci více analytů v jednom vzorku. Kvantifikace cytokinů

byla provedena ve spolupráci s Dr. Vrzalovou v Laboratoři imunochemické diagnostiky ve Fakultní nemocnici v Plzni.

Z výsledků expozičních testů je patrné, že všechny tři druhy buněčných linií pozitivně reagovaly na expozici bakteriálnímu lipopolysacharidu produkcí tří ze čtyř sledovaných cytokinů (TNF- α , IL-6 a GM-CSF). V souladu s naším očekáváním se tento *ex vivo* systém ukázal jako vhodný pro hodnocení vlivu testovaných vzorků na iniciaci zánětlivé reakce. Ze studovaných imunoglobulinů pouze Fab fragment slepičích IgY výrazněji stimuloval produkci (sekreci) některého z cytokinů. V případě buněčných linií CuFi a NuLi se jednalo o cytokin IL-1 β , který několikanásobně převyšoval hodnoty koncentrace vyvolané LPS (viz obr. 3 publikace č. 1, str. 58) a u nádorové linie A549 byl na úroveň LPS indukován cytokin IL-6. Jedná se o překvapivý výsledek, neboť Fab fragment IgY, stejně jako Fab fragment IgG, by neměl mít zánětlivý vliv na rozdíl od celé molekuly imunoglobulinu, obsahující Fc fragment, který např. u IgG zprostředkovává interakce se složkami imunitního systému (Sarnesto a kol. 1983; Merakou a kol. 2018). Tento neobvyklý výsledek pro Fab fragment IgY koreluje se závěry naší předchozí studie provedené na potkanech. U experimentálních zvířat, která inhalovala Fab fragment IgY, došlo k významnému zvýšení koncentrace cytokinu IL-1 β a v menší míře i cytokinů IL-18 a GM-CSF v séru (Hadrabová a kol. 2014). Důvod proč Fab fragment IgY vyvolal produkci zmíněných cytokinů jak v buněčných liniích, tak i u modelových zvířat není dosud znám.

Při porovnání indukčního efektu slepičích a savčích imunoglobulinů, v buněčných liniích zdravého jedince (NuLi), vzorek slepičí IgY zvýšil hladinu pouze IL-6 a kozí IgG indukoval cytokin TNF- α na úroveň hodnot po expozici LPS. Lidský imunoglobulin IgG nevyvolal navýšení koncentrace žádného ze sledovaných analytů ani u jedné z buněčných linií. Ani v případě ovalbuminu získaná data neprokázala, že by při použité koncentraci vyvolával zánětlivou odpověď a případná kontaminace IgY frakce tímto proteinem by neměla komplikovat využití slepičích protilátek pro terapeutické účely.

Vedle vzájemného porovnání jednotlivých testovaných vzorků je též důležité znát vztah koncentrací cytokinů v buněčném médiu vzhledem k fyziologickým hodnotám v lidském séru. Sérové koncentrace TNF- α $3,21 \pm 4,04$ pg/ml, IL-1 β $2,04 \pm 4,93$ pg/ml a GM-CSF $40,9 \pm 108,6$ pg/ml (Kim a kol. 2011) poskytly základ pro hodnocení a interpretaci našich výsledků z hlediska imunogenicity testovaných imunoglobulinů, i přesto, že přímé srovnání koncentrací cytokinů v séru a buněčných médiích nemusí být

zcela relevantní. V tomto kontextu můžeme konstatovat, že fyziologická hladina cytokinů v séru byla překročena pouze ve dvou případech, kdy byly buněčné linie CuFi a NuLi vystaveny působení Fab fragmentu. Koncentrace cytokinu IL-1 β vylučovaného do média NuLi buňkami byla cca 5krát vyšší než fyziologická hladina v séru a v případě CuFi buněk se jednalo pouze o mírné zvýšení hladiny tohoto cytokinu.

Závěrem je tedy možno shrnout, že IgY nepůsobí zánětlivě na úrovni testovaných buněčných linií a s výjimkou určitého navýšení hladiny cytokinu IL-6 ani na úrovni modelových zvířat. Dle našich výsledků by tedy tento imunoglobulin mohl být použit jako nástroj pasivní imunizace. Zároveň bylo potvrzeno, že ovalbumin (možná kontaminanta IgY frakce) v množství menším než 1 mg/ml by neměl komplikovat využití IgY vyvoláním nežádoucích reakcí.

Effect of chicken antibodies on inflammation in human lung epithelial cell lines

Božena KUBICKOVÁ, Barbora MAJEROVÁ, Jana HADRABOVÁ,
Libuše NOSKOVÁ, Marie STIBOROVÁ, Petr HODEK

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague 2, Czech Republic

Correspondence to: Prof. RNDr. Petr Hodek CSc
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague,
Albertov 2030, 128 40 Prague 2, Czech Republic.
TEL: +420-221951285; FAX: +420-221951283; E-MAIL: hodek@natur.cuni.cz

Submitted: 2014-09-23 Accepted: 2014-11-08 Published online: 2014-11-30

Key words: **cystic fibrosis; chicken antibody; pro-inflammatory markers; epithelium cell lines**

Neuroendocrinol Lett 2014;35(Suppl. 2):99–104 PMID: 25638373 NEL351014A11 © 2014 Neuroendocrinology Letters • www.nel.edu

Abstract

OBJECTIVES: As an alternative therapeutic approach for the prevention and treatment of bacterial infections with *P. aeruginosa* of cystic fibrosis (CF) patients, chicken yolk antibodies (IgY) could be used. The most significant advantage of IgY, in contrast to mammalian IgG, consists in the fact, that when bound to the antigen, they usually do not induce inflammatory reaction. In addition, the simplicity of egg production and the ease of IgY preparation makes this kind of antibody an excellent tool for passive immunization. Thus, the aim of our project was to study the effect of IgY and its Fab fragment on the potential induction of pro-inflammatory reactions in lung epithelial cells.

METHODS: Chicken IgY were prepared from pooled egg yolks. Fab fragments of IgY were purified from the papain digest of IgY using DEAE-Sephacel ion exchange chromatography. Their purity was verified by SDS electrophoresis in polyacrylamide gel. Immortalized human cell lines, CuFi (CF patient) and NuLi (healthy subject), and A549 (human adenocarcinoma cells) were exposed to IgY, Fab, OVA, LPS (positive control), PBS (negative control), and human and goat IgG for 24 hours. The concentration of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 and GM-CSF were determined in cell media using the BioPlex method, which enables the quantification of multiple analytes simultaneously in one sample.

RESULTS: Our results show that i) the Fab fragment induced levels of some pro-inflammatory cytokines, when compared to the PBS control, whereas ii) chicken IgYs did not induce any notable production of pro-inflammatory cytokines in contrast to intense effect of LPS on TNF- α and GM-CSF. In summary, our data show that levels of all cytokines are comparable with physiological values in human serum except of IL-1 β , which concentration in cell medium was markedly elevated by Fab fragment.

CONCLUSIONS: The present data indicate that IgY are not inflammatory for lung cells and thus they are possibly applicable for prevention of airway bacterial infections.

To cite this article: Neuroendocrinol Lett 2014;35(Suppl. 2):99–104

Božena Kubickova, Barbora Majerova, Jana Hadrabová, Libuše Nosková, Marie Stiborová, Petr Hodek

Abbreviations:

A549	- cell lines derived from lung adenocarcinoma (58-year old patient)
BCIP	- 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate
BEGM	- bronchial epithelial cell growth medium
BSA	- bovine serum albumin
CuFi	- immortalized human epithelial cells isolated from lungs (14-year-old female patient with cystic fibrosis)
CF	- cystic fibrosis
Fab	- antigen-binding fragment
Fc	- crystallizable fragment
gIgG	- goat IgG
GM-CSF	- granulocyte macrophage-colony stimulating factor
hIgG	- human IgG
IgY	- chicken yolk antibody
IL	- interleukin
LPS	- lipopolysaccharide
NBT	- nitro-blue tetrazolium
NuLi	- immortalized human epithelial cells isolated from the lungs (healthy 36-year old man)
OVA	- ovalbumin
PBS	- sodium phosphate buffered isotonic saline pH 7.4
PBS-Tw	- PBS containing 0.05% Tween 20
SDS-PAGE	- sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TNF- α	- tumor necrosis factor α
TMB - 3,3',5,5'	- tetramethylbenzidine

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the gene coding for the CF transmembrane conductance regulator. The major clinical problem for patients with CF has been over many years caused by chronic microbial infections (e.g. *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, *Aspergillus spp.*, *Staphylococcus aureus*), which are facilitated by decreased mucociliary clearance. These infections result in progressive loss of pulmonary function and consequently in early death of CF patients (Campodónico *et al.* 2008). The cure is frequently based on antibiotic prophylaxis in order to suppress the infection. Antibiotic therapy is often complicated by the bacterial resistance and thus new ways of therapy are considered.

Chicken yolk antibody (IgY) may provide an alternative therapeutical approach for prevention and treatment of *P. aeruginosa* infections. These IgYs are superior to mammalian IgGs in several aspects. Avian IgY antibodies do not fix mammalian complement components nor bind human Fc receptors, hence do not trigger antibody mediated biological responses such as phagocytosis, endocytosis, antibody-dependent cellular cytotoxicity, release of inflammatory mediators, and enhancement of antigen presentation, which might endanger CF patients (Carlander *et al.* 1999). Avian IgYs are generally suggested to neutralize or inactivate bacterial virulence factors in a similar way as mammalian IgGs do. Thus, chicken IgYs have been examined as a tool for oral immuno-prophylaxis, as well as medication for therapy of infectious diseases. For instance, the oral administration of IgY prevented infection

due to rotavirus infection in mice (Ebina *et al.* 1990). Data of other studies indicate a dose dependent effect of specific egg yolk antibodies on bovine coronavirus-induced diarrhea of newborn calves. Moreover, the orally administered IgY raised against enterotoxigenic *E. coli* provided protection from diarrhea of neonatal pigs (Dias da Silva *et al.* 2010). In addition, production of avian IgY antibodies and their purification is quite simple which makes their extensive production and application feasible (Hodek *et al.* 2013).

In this study, we examined the potential pro-inflammatory properties of IgYs on the basis of cytokine production. To assess IgY as a tool for passive immunization of CF patients against bacterial airway infections, we have tested IgY and IgY-derived Fab fragments *ex vivo* in a cell model system derived of lung epithelium of healthy subject (NuLi) and of CF patient (CuFi). The data presented in this article prove that the IgYs (possible Fab) are not inflammatory and might be used for anti-bacterial prophylaxis.

MATERIAL AND METHODS

Production and purification of chicken antibodies IgY and IgY-derived Fab fragments

Production of IgY from conventional eggs

A two-step procedure, consisting of yolk extraction by tap water (8-fold dilution, freezing, and filtration) followed by IgY precipitation at pH 4 with sodium chloride in the final concentration of 8.8% (Hodek *et al.* 2013), was used for the IgY preparation. IgY fractions were stored in PBS, pH 7.2 (containing 0.02% sodium azide). The purity and recovery of IgY in water-soluble fractions was monitored by the sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Proteolytic digestion with papain

The proteolytic digestion with papain was carried out as described by Akita *et al.* (1993) and Bereli *et al.* (2005). It yielded providing three cleavage products of IgY, two 44 kDa Fab (antigen-binding) fragments, and one Fc (crystallizable) fragment – size 55 kDa. Papain at the final concentration 0.028 mg/ml was activated with cysteine (the final concentration 0.011 mg/ml) and dithiothreitol (the final concentration 0.030 mg/ml) in 50 mM TRIS/HCl buffer (pH 7.2) under stirring for 25 min at 37°C. IgY was digested at the ratio of 23:1 (IgY:enzyme) for 15 hours at 37°C under stirring. The reaction was stopped by addition of iodoacetamide to a final concentration of 15 mM.

Chromatographic separation of cleaved IgY

Products of IgY cleavage were separated by ion exchange chromatography using a weak anion exchanger diethylaminoethyl-cellulose (DEAE-Sephacel). Before separation, the sample was dialyzed against the equilibration buffer (10 mM TRIS/HCl, pH 8.6). After sample appli-

cation, the column was washed with the equilibration buffer (washing away non-bound antibody fragments) and the Fab fragment was eluted with 100 mM TRIS/HCl buffer (pH 8.0). The Fc fragment was released with 100 mM TRIS/HCl containing 200 mM NaCl (pH 8.0). The elution profile was monitored at 280 nm.

Western blots

The isolated Fab and Fc fragments were examined by Western blotting on the Immobilon-P membrane (Millipore, Bedford, MA) as described earlier (Krizkova *et al.* 2009). Five μ g of Fab, Fc and IgY in reduced buffer were applied in triplicates onto SDS-containing 12% polyacrylamide separation gel. The blot after the electrotransfer was blocked in a solution of 5% skim milk in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-Tw) and cut into 3 separate strips, each containing Fab, Fc and IgY. The strips were incubated with concanavalin A (0.05% in 3% BSA in PBS-Tw), anti-chicken IgY Fab goat IgG (1 μ g/ml of 3% BSA in PBS-Tw), or PBS-Tw, respectively. The strip treated with concanavalin A was subsequently incubated with horseradish peroxidase (0.1 mg/ml of 3% BSA in PBS-Tw) and the strip treated with PBS-Tw was then incubated with anti-chicken IgY rabbit IgG-peroxidase conjugate (1:1 000 diluted in 5% skim milk). Subsequently, both strips were developed with the peroxidase substrate, SigmaFast 3,3'-diaminobenzidine tablets. The third strip, treated with anti-IgY Fab primary antibody, was incubated with alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-goat IgG (0.08 μ g/ml of 5% skim milk in PBS-Tw) and protein bands were visualized with the alkaline phosphatase substrate, BCIP/NBT tablet.

Cell exposure and cytokine assay

Three types of lung epithelial cells were used in this study: i) NuLi-immortalized cells originally isolated from the lungs of healthy 36-year old man, ii) CuFi – immortalized cells from lungs of 14-year-old female patient suffering from cystic fibrosis and iii) A549 – cell lines derived from lung adenocarcinoma of 58-year old patient (from alveolar type II cells).

Immortalized epithelial cell lines NuLi and CuFi were cultivated in a BEGM medium (Bronchial epithelial cell growth medium, Lonza). For the cultivation of an A549 cell line, the DMEM medium (PAA Laboratories, glucose free) with addition of amino acids 0.28 mM L-alanine, 0.25 mM L-asparagine, 0.225 mM L-aspartic acid, 0.51 mM L-glutamic acid, 0.35 mM L-proline and 2 mM L-glutamine was used. The medium was further supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and gentamycine (50 μ g/ml). The cells were cultured at 37°C with 5% CO₂. The cells were transferred from cultivation flasks to 24-well tissue culture plates Cell-BIND (Corning, U.S.A.) and grown to confluence. Cells in wells were exposed to chicken IgY, its fragment Fab, human (hIgG) and goat (gIgG) IgG (Sigma Chemical Co., USA), OVA (Serva, Germany), respectively, or

PBS (negative control) in final concentrations of 1 mg/ml for 24 hours. As a positive control, 80 μ g/ml LPS was used in the exposition experiments. Concentrations of cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 and GM-CSF were determined in cell media using BioPlex method, which enables the quantification of multiple analytes simultaneously in one sample. Fluorescent detection with dual laser allows determining both the type and concentrations of cytokine based on the detection of micro particles carrying specific anti-cytokine antibody. The Bio-Plex assay was performed on MAGPIX Multiplex Reader 60 in collaboration with Dr. Vrzalová (Laboratory of immunochemical diagnosis, University Hospital in Pilsen).

RESULTS

Preparation of IgY samples

The prepared IgY (300 mg) was in part enzymatically digested with papain to the Fab (44 kDa) and Fc (55 kDa) fragments. The digest was separated on DEAE-ion exchange chromatography. The elution profile is shown in Figure 1. The fractions with a high protein content were subjected to electrophoretic analysis. Figure 2 indicates that ion exchange chromatography successfully separated Fab from Fc fragments. The

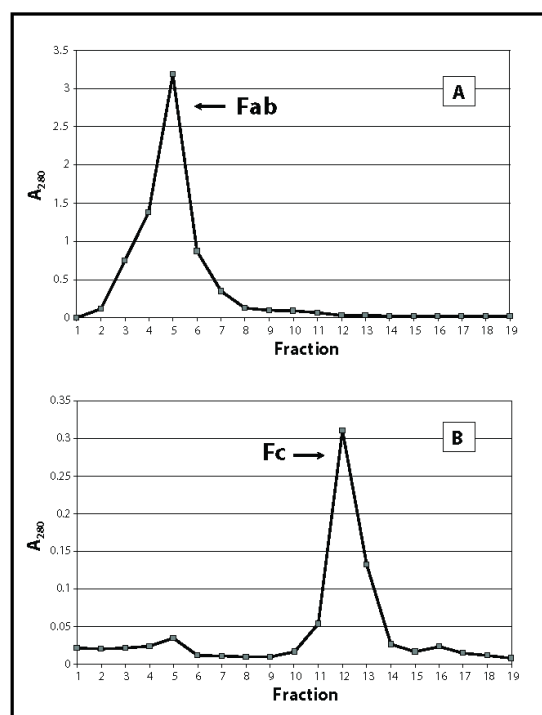


Fig. 1. Separation of IgY papain digest on DEAE-Sephacel. The column was eluted with 100 mM TRIS-HCl, pH 8.0 to collect the Fab fraction (panel A). The Fc fragment was eluted with 100 mM TRIS-HCl, pH 8.0, containing 200 mM NaCl (panel B).

Božena Kubickova, Barbora Majerova, Jana Hadrabova, Libuse Noskova, Marie Stiborova, Petr Hodek

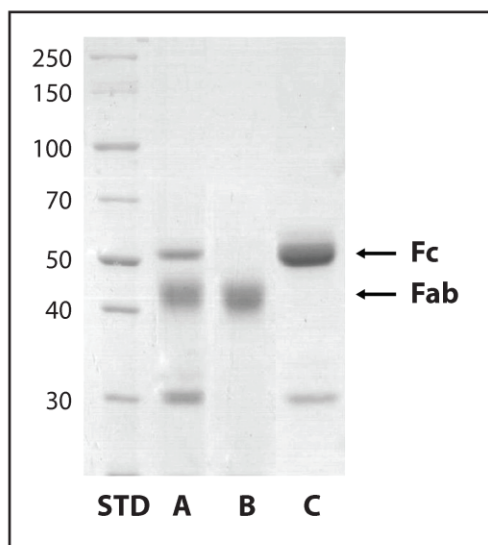


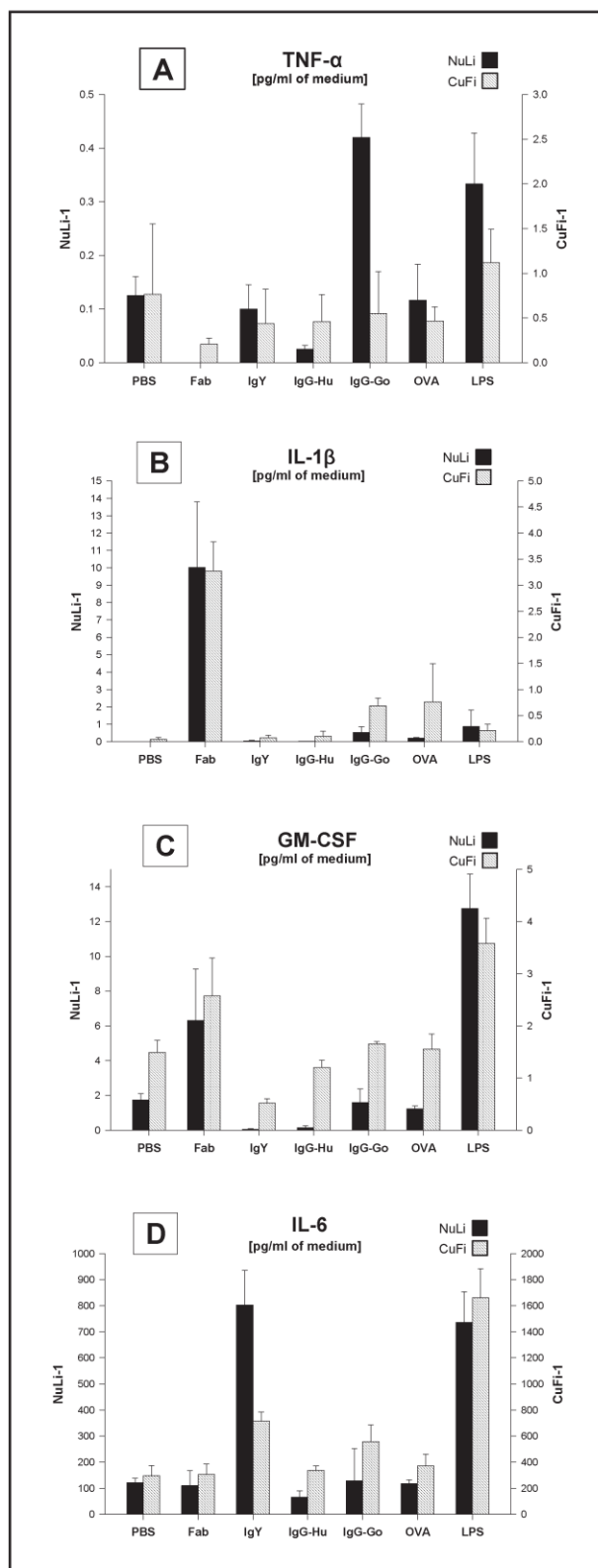
Figure 2. SDS-electrophoresis on 12% polyacrylamide separation gel under reduced conditions. Lines labeled as STD, A, B, and C were loaded with molecular weight standards (Page Ruler Broad Range), IgY papain digest, Fab fraction, and Fc fraction, respectively. Arrows show relative mobility of Fc and Fab fragments. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 for proteins.

Fab fragment was also identified with a specific antibody on Western blots. The presence of carbohydrate components of the Fc fragment was detected with concanavalin A, recognizing its mannosylation site (data not shown).

Exposure tests and cytokine assays

The influence of chicken IgY, its Fab fragment and mammalian immunoglobulins, human and goat IgG, on the production of inflammatory cytokines was examined with A549, CuFi and NuLi cells lines. Other compounds, OVA (possible contaminant of IgY fraction) and bacterial LPS (known inducer of cytokines) (Hansen, L. *et al.* 1999) were also included in the tests. Determination of cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 and GM-CSF in the cell medium was performed using the Bio-Plex method. Data are presented in Figure 3 for each cytokine separately.

Figure 3. Cytokine concentrations in CuFi and NuLi cell cultures. Cytokines TNF- α (panel A), IL-1 β (panel B), GM-CSF (panel C) and IL-6 (panel D) were determined by Bioplex assay. CuFi (hatched bars) and NuLi (black bars) cells were treated with PBS, the Fab fragment of IgY (Fab), chicken yolk immunoglobulin (IgY), human IgG (IgG-Hu), goat IgG (IgG-Go), egg ovalbumin (OVA) in the final concentration of 1 mg/ml or 80 μ g/ml bacterial lipopolysaccharide (LPS). Plotted data are means \pm S.D. of three independent measurements.



Treatment of A549 cells

The tumor cell line A549 produced cytokines in trace concentrations, which did not allow their precise detection. Cytokine IL-6 was the only detectable analyte. In response to the Fab fragment, this cytokine was induced to levels comparable to LPS. Other samples induced IL-6 to much lower extent. It is possible to conclude that goat IgG stimulated the production to higher extent than human IgG (data not shown).

Treatment of NuLi cells

The immortalized cell line NuLi of healthy individual secreted detectable amounts of cytokines IL-1 β , IL-6 and GM-CSF. Whereas concentrations of TNF- α were close to detection limit (0.6 pg/ml), some increase of this cytokine was detected for gIgG exposure. The production of IL-1 β (compared to PBS control) was not induced by any immunoglobulin used. From all other compounds studied, only the Fab fragment elevated levels of IL-1 β . Similarly, the Fab fragment markedly stimulated production of GM-CSF. Contrary to the impact on IL-1 β , LPS induced GM-CSF more than the Fab fragment did. IgY did not caused any induction of GM-CSF. Formation of cytokine IL-6 shows the opposite trend in respect to Fab and IgY. The presence of IgY increased the IL-6 to the level that is comparable to the effect of LPS. In NuLi cells LPS proved to be the most effective stimulant of selected cytokines with the exception of IL-1 β induction by the Fab fragment.

Treatment of CuFi cells

All four types of inflammatory cytokines were measured in immortalized CuFi cell line originating from CF patient airways. Similarly to NuLi cell, TNF- α formation was close to the detection limits. Thus, none of the tested compounds caused significant elevation of this cytokine. In line with results from NuLi cells the production of IL-1 β (compared to PBS control) was highly induced by the Fab fragment to levels exceeding the effect of LPS. Some, but much lower effect of Fab fragment was detected on the GM-CSF production. Chicken IgY did not induce this cytokine. In contrast, cytokine IL-6 was slightly induced by IgY, whereas the Fab fragment caused only a low impact on IL-6 induction.

DISCUSSION

Chicken eggs are becoming a widely respected source of unique antibodies. The preparation of IgYs from egg yolks is, in comparison to the procedure utilizing blood of mammals, more acceptable from the point of view of animal welfare. Moreover, the possibility of a large scale production of IgY, makes chicken immunoglobulins an excellent tool for passive immunization. Thus, egg yolk immunoglobulins might be considered for prevention of infections with opportunistic pathogens affecting e.g. lungs of CF patients.

The aim of this study was to determine the effect of IgY on epithelial cells in the respect to inflammation development. The secretion of selected cytokines in cell media was determined to trace initial signs of a possible inflammatory reaction caused by IgY. Beside the IgY, the Fab fragment was included in exposure tests, too, as it is assumed to be less immunogenic than IgY due to the absence of a glycosylation site and a reduced molecular weight (Sarnesto *et al.* 1983; Cheung *et al.* 2003). It was confirmed by SDS-electrophoresis that the most of Fab fragment fractions contained only insignificant amounts of additional protein of a similar molecular weight as the Fc fragment. Experiments with OVA were carried out to examine the impact of this protein, which might be a possible contaminant of IgY fractions.

The data of Bioplex assay show that all epithelial cells responded effectively to LPS *via* secretion of three of pro-inflammatory cytokines studied. This observation confirms that under conditions used, the *ex vivo* cell cultivation allows to evaluate the effect of tested compounds on the induction of inflammatory reactions. Of the all immunoglobulins, only the Fab fragment of IgY highly stimulated levels of IL-1 β and GM-CSF in CuFi and NuLi cell lines. Although A549 cells mostly did not produced detectable amounts of cytokines, the Fab fragment induced cytokine IL-6 to levels comparable to LPS. By analogy to human IgG, the Fab fragment of IgY should be less immunogenic than the Fc fragment or the whole immunoglobulin molecule (Sarnesto *et al.* 1983), however, our data contradict this assumption. In our previous experiments with rats, we observed that Fab, when inhaled, induced the production of IL-1 β in serum. Likewise, although to a lesser extent, the treatment with Fab increased serum concentrations of IL-18 and GM-CSF (Hadrabova *et al.* 2014). The reason why Fab triggered the induction of cytokines in epithelial cell lines is unclear.

When comparing cytokine inducing effects of immunoglobulins tested, IgY increased solely levels of IL-6 in both cell lines comparably. In CuFi cells, the IgY-mediated stimulation of IL-6 formation was similar to that produced by the other immunoglobulin of foreign origin, goat IgG. On the other hand, OVA at a concentration of 1 mg/ml was not demonstrated to provide any marked inflammatory response. Hence, the possible presence of OVA in the IgY sample does not play a significant role.

It is interesting to compare concentrations of determined cytokines in a cell medium with their physiological values in human serum. Concentration of TNF- α , IL-1 β and GM-CSF in serum are 3.21 pg/ml, 2.04 pg/ml and 40.9 pg/ml, respectively (Kim *et al.* 2011). Although the direct comparison of cytokine concentrations in serum and cell media might be misleading, the serum values provide a basis for our result interpretation. Given of these data we can state that serum physiological levels were exceeded only in two cases when CuFi and NuLi cells were exposed to the Fab fragment. The

Božena Kubickova, Barbora Majerova, Jana Hadrabova, Libuse Noskova, Marie Stiborova, Petr Hodek

concentration of cytokine IL-1 β secreted to media by NuLi cells was ~5 folds higher than the serum level, while the only slight increase of IL-1 β was found with CuFi cells.

Present data confirmed our previous results from animal studies (Hadrabova *et al.* 2014) that IgY is not inflammatory and therefore might be considered as a tool of passive immunization. Since the Fab fragment of IgY was shown to be inflammatory for cells that should be taken under consideration when possible used *in vivo*.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by UNCE 204025/2012 and GAUK 1584814 of the Charles University in Prague

REFERENCES

- 1 Akita EM, Nakai S (1993). Production and purification of Fab' fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). *J Immunol.* **162**: 155–164.
- 2 Bereli N, Akgöl S, Yavuz H, Denizli A (2005). Antibody purification by concanavalin A affinity chromatography. *J Appl Polym Sci.* **97**: 1202–1208.
- 3 Campodónico VL, Gadjeva M, Paradis-Bleau C, Uluer A, Pier GB (2008). Airway epithelial control of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Trends Mol Med.* **14**(3): 120–33.
- 4 Carlander D, Ståhlberg J, Larsson A. (1999). Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. *Ups J Med Sci.* **104**: 179–89.
- 5 Cheung GLM, Thomas TM (2003). Purification of antibody Fab and F(ab')₂ fragments using GradiFlow technology. *Protein Expr Purif.* **32**: 135–140.
- 6 Dias da Silva W, Tambourgi DV (2010). IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol.* **135**: 173–80.
- 7 Ebina T, Tsukada K, Umezu K, Nose M, Tsuda K, Hatta H, Kim M, Yamamoto T (1990). Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin (IgY) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation (PSK). *Microbiol Immunol.* **34**: 617–629.
- 8 Hadrabova J, Majerova B, Cerna V, Moserova M, Holusa R, Mandys V, Stiborova M, Striz I, Hodek P (2014). Chicken immunoglobulins for prophylaxis: Effect of inhaled antibodies on inflammatory parameters in rat airways. *J Appl Biomed.* *in press*
- 9 Hansen L, Poulsen OM, Würtz H (1999). Endotoxin potency in the A549 lung epithelial cell bioassay and the limulus amoebocyte lysate assay. *J Immunol Methods* **226**: 49–58.
- 10 Hodek P, Trefil P, Simunek J, Hudecek J, Stiborova M (2013). Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. *Int J Electrochem Sci.* **8**: 113–124.
- 11 Kim HO, Kim HS, Youn JC, Shin EC, Park S (2011). Serum cytokine profiles in healthy young and elderly population assessed using multiplexed bead-based immunoassays. *J Transl Med.* **9**: 113–119.
- 12 Krizkova J, Burdova K, Stiborova M, Kren V, Hodek P (2009). The effects of selected flavonoids on cytochromes P450 in rat liver and small intestine. *Interdiscip. Toxicol.* **2**: 201–204.
- 13 Sarnesto A, Ranta S, Seppälä IJT, Makela O (1983). Relative immunogenicity in mice of different regions of the human IgG. *J Immunol.* **17**: 507–511.

3.2. Přiložená publikace č. 2

Fluorescent Cellular Assay for Screening Agents Inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* Adherence

Libuše Nosková, **Božena Kubíčková**, Lucie Vašková, Barbora Bláhová, Michaela Wimmerová, Marie Stiborová, Petr Hodek

Sensors, 15:1, 1945-1953, doi: 10.3390/s150101945 (2015), IF=3,275

Podíl disertantky na prezentované publikaci: Participace na plánování experimentů, práce s buněčnými liniemi a bakteriálními kulturami (fluorescenční značení), stanovení bakteriální adheze pomocí adhezního testu, vyhodnocení experimentálních dat a jejich statistické zpracování.

Počátečním krokem vzniku mikrobiální infekce je adheze bakterií na buňky hostitele. Jedním z virulenčních faktorů *Pseudomonas aeruginosa*, který se účastní vazby na epitelální buňky, je lektin PAIIL. Inhibiční protilátky cílené na tento protein mohou efektivně zabránit vzniku infekce. Abychom mohli studovat profylaktický vliv nejen těchto protilátek, ale i různých dalších sloučenin, bylo třeba vyvinout účinnou metodu, která by umožnila kvantifikovat míru bakteriální adherence na epitelální buňky.

Pro získání IgY proti lektinu PAIIL byla nejprve provedena imunizace slepic rekombinantním lektinem PAIIL získaným od prof. Wimmerové (Centrální laboratoř interakce a krystalizace biomolekul, Masarykova univerzita v Brně). Polyklonální žloutkové protilátky, anti-PAIIL IgY, byly připraveny z vajec imunizovaných slepic podle protokolu Hodek a kol. (2013). Produkce anti-PAIIL IgY v průběhu imunizace slepic byla potvrzena pomocí metod ELISA a Western blot. Protilátky rozpoznávaly lektin PAIIL jak v rekombinantním vzorku, tak i v bakteriálním lyzátu PA. Naopak preimunní IgY, získané z vajec odebraných týden před imunizací slepic, vazebnou aktivitu k lektinu PAIIL nevykazovaly a v následných experimentech proto sloužily jako kontrolní vzorky.

K hodnocení vlivu anti-PAIIL IgY na adhezi *Pseudomonas aeruginosa* na epitelální buňky byl vyvinut adhezní *ex vivo* test. Experimentální systém je založen na využití adherentních plicních epitelálních buněk, které byly v podobě konfluentní vrstvy vystaveny působení PA v přítomnosti (či nepřítomnosti) anti-PAIIL IgY a dalších testovaných sloučenin. Pro napodobení podmínek v dýchacím traktu pacientů s CF byly zvoleny opět lidské plicní immortalizované buněčné linie CuFi a pro srovnání se zdravými jedinci buněčná linie NuLi. Z bakteriálních kmenů PA byl vybrán kmen ST1763 izolovaný z pacienta s CF. Pro přesnou kvantifikaci bakteriálních a epitelálních buněk byly oba typy buněk značeny fluorescenčními barvivami PKH (dle protokolu výrobce Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Výhodou těchto lipofilních buněčných barviv je především to, že neovlivňují povrchové struktury buněk, které jsou důležité pro adhezi PA, mají minimální vliv na viabilitu buněk a v neposlední řadě umožňují dlouhodobé monitorování buněk *in vivo*.

Vhodná volba jednotlivých barviv s odlišnými maximy excitační a emisní vlnové délky (excitační a emisní vlnová délka 522 nm a 569 nm pro PKH26 - pro kvantifikaci bakterií, respektive 470 nm a 505 nm pro PKH67 - pro kvantifikaci epitelálních buněk) umožňuje měření fluorescence obou typů buněk současně přítomných v jamce testovací destičky bez vzájemné interference barviv. Epitelální buňky obarvené fluorescenčním

barvivem PKH67 s emisí v zelené oblasti a bakteriální buňky obarvené PKH26 s emisí v červené oblasti jsou znázorněny na obrázku 2 (publikace č. 2, str. 70).

Během pilotních experimentů byla testována také doba inkubace epitelálních buněk s PA. Neadherované bakterie byly v jednotlivých časových intervalech intenzivním promytím jamek odstraněny a počet asociovaných buněk *Pseudomonas aeruginosa* s epitelálními buňkami byl kvantifikován měřením fluorescence. V případě počátečního poměru cca 30 bakteriálních buněk aplikovaných na jednu epitelální buňku se počet vázaných PA v čase zvyšoval lineárně. Z výsledků lze usoudit, že k adhezi dochází velmi rychle, neboť i v počátečním čase, kdy byly bakterie odstraněny okamžitě po jejich aplikaci k buněčným liniím, bylo zaznamenáno detekovatelné množství adherovaných PA. Pro další adhezní experimenty byla zvolena dvouhodinová doba inkubace, aby byla umožněna přesná kvantifikace adherovaných PA díky dostatečně vysoké hodnotě relativní fluorescence.

Do testování inhibičního vlivu na adhezi PA byly kromě anti-PAIIL IgY a preimunních IgY zahrnuty také dva sacharidy L-fukosa, rozpoznávaná lektinem PAIIL, a D-galaktosa specifická pro druhý bakteriální lektin PAII. Kompletní experimentální uspořádání adhezního testu bylo následující: uvedené sloučeniny byly po dobu 10 minut preinkubovány s bakteriální suspenzí PA, fluorescenčně značenou PKH26 a poté aplikovány na konfluentní vrstvu buněk CuFi nebo NuLi, značených pomocí PKH67; po dvouhodinové inkubaci buněk s bakteriemi byly nepřichycené bakteriální buňky odstraněny a množství adherovaných bakterií a epitelálních buněk bylo stanoveno fluorimetricky. Výsledky byly vyjádřeny jako poměr relativní fluorescence PA buněk / epitelálních buněk (PA/CuFi nebo PA/NuLi).

Z výsledného grafu na obrázku 5 (publikace č. 2, str. 72) je patrné, že protilátky cílené na lektin, anti-PAIIL IgY, dle očekávání významně snížily množství adherovaných bakterií jak na CuFi, tak i NuLi buněčné linie ve srovnání s přidavkem jen PBS, přičemž větší protektivní vliv anti-PAIIL IgY byl pozorován u CuFi buněk (více než 50% pokles oproti PBS) než u NuLi buněk (cca 37% pokles oproti PBS). Překvapivý výsledek poskytly preimunní IgY, které naopak stimulovaly asociaci PA s oběma buněčnými liniemi. Tento neočekávaný účinek kontrolních IgY na adhezi PA může být způsoben aglutinací bakteriálních buněk. Jednotlivé buňky PA jsou propojovány přes dimerní sacharidové části Fc fragmentu IgY, na které se PA váží svými lektiny PAIIL. Vzniklé agregáty, které byly pozorovány i pod fluorescenčním mikroskopem, obsahují shluky bakteriálních buněk, jejichž odmytí z jamky destičky je pak méně účinné. Důvod, proč

ke stejnému jevu nedochází i u protilátek cílených proti lektinu, spočívá pravděpodobně v tom, že vazebné místo pro sacharid na lektinu PAIIL je přednostně blokováno navázáním specifické anti-PAIIL IgY. Tak je znemožněna intreakce lektinu se sacharidy na Fc fragmentu protilátky. Uvedené výsledky dokumentují nejen schopnost připravených protilátek anti-PAIIL IgY inhibovat povrchový lektin PAIIL *Pseudomonas aeruginosa* při vazbě na plicní epitel, ale také zabránit vazbě lektinu na sacharidovou část Fc fragmentu protilátek.

Z porovnání míry adheze PA v experimentálním uspořádání bez přítomnosti testovaných protilátek či sacharidů (pouze s PBS) je patrné, že buněčné linie pacienta s CF (CuFi) jsou náchylnější k adhezi tohoto patogenu než linie zdravého jedince (NuLi) a to zhruba o 30 %. Tento výsledek dokazuje, že nově vyvinutý *ex vivo* adhezní test relativně dobře odpovídá podmínkám v respiračním traktu pacientů s CF.

Mezi lektiny, které se účastní adheze PA k sacharidovým strukturám na povrchu epiteliálních buněk, patří kromě PAIIL také lektin PAIL (viz kap. 1.2.1). Asociace patogenu s epiteliálními buňkami a následný rozvoj infekce by tedy mohl být inhibován i prostřednictvím sacharidů D-galaktosy a L-fukosy, které soutěží o vazebná místa lektinů PAIL a PAIIL. Jako alternativní profylaxe infekcí PA u pacientů s CF byla testována inhalace těchto dvou sacharidů v rámci studie provedené Hauber a kol. (2008), kdy bylo pozorováno významné snížení množství PA ve sputu nemocných CF (ve srovnání s množstvím před terapií sacharidy). Oproti tomu z našich výsledků vyplývá, že D-galaktosa ani L-fukosa nepůsobily na testované buněčné linie protektivně vzhledem k adhezi PA. V případě CuFi buněčné linie došlo ve srovnání s experimentálním uspořádáním s PBS pouze k zanedbatelnému snížení asociace PA, u buněčné linie NuLi dokonce přítomnost obou sacharidů významně zvýšila adhezi PA. Problém zřejmě spočívá v tom, že nemodifikované sacharidy mohou být PA využity jako nutriční zdroj vedoucí k jejich pomnožení. Podle Chemani a kol. (2009), kteří pro *in vivo* experimenty využili myši, jimž byla aplikována bakteriální suspenze PA s methylovanými sacharidy, α -methyl-D-galaktosidem nebo α -methyl-L-fukosidem jako inhibitory lektinů, došlo ke snížení rozvoje infekce i mortality pokusných zvířat. Stejný výsledek byl pozorován i na buněčných liniích A549, kdy modifikované sacharidy snížily cytotoxicitu PA.

Z uvedených výsledků vyplývá, že se podařilo vyvinout test adheze PA na buněčné linie založený na stanovení duální fluorescence, který byl využit pro studium inhibice adheze PA. Díky tomu bylo možno ověřit profylaktický vliv připravených

protilátek proti bakteriálnímu lektinu PAIIL, které účinně inhibovaly adhezi patogenu na plicní buněčné linie.

Article

Fluorescent Cellular Assay for Screening Agents Inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* Adherence

Libuše Nosková ¹, Božena Kubičková ¹, Lucie Vašková ¹, Barbora Bláhová ¹,
Michaela Wimmerová ², Marie Stiborová ¹ and Petr Hodek ^{1,*}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Hlavova 8, 128 40 Prague 2, Czech Republic; E-Mails: noskova.libuse@seznam.cz (L.N.); bojaku@gmail.com (B.K.); luci.vaskova@gmail.com (L.V.); bara.blahova@volny.cz (B.B.); stiborov@natur.cuni.cz (M.S.)

² Central European Institute of Technology, Masaryk University, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Czech Republic; E-Mail: michaw@chemi.muni.cz

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: hodek@natur.cuni.cz; Tel.: +420-221-951-287; Fax: +420-221-951-283.

Academic Editor: Libuše Trnková

Received: 27 October 2014 / Accepted: 9 January 2015 / Published: 16 January 2015

Abstract: Antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* (PA) lectin, PAIIL, which is a virulence factor mediating the bacteria binding to epithelium cells, were prepared in chickens and purified from egg yolks. To examine these antibodies as a prophylactic agent preventing the adhesion of PA we developed a well plate assay based on fluorescently labeled bacteria and immortalized epithelium cell lines derived from normal and cystic fibrosis (CF) human lungs. The antibodies significantly inhibited bacteria adhesion (up to 50%) in both cell lines. In agreement with *in vivo* data, our plate assay showed higher susceptibility of CF cells towards the PA adhesion as compared to normal epithelium. This finding proved the reliability of the developed experimental system.

Keywords: cystic fibrosis; lungs; bacterial infection; lectin; chicken antibody; cell line; dual fluorescence

1. Introduction

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disorder caused by mutations in a single gene coding for the CF transmembrane conductance regulator (CFTR) protein [1]. Pathophysiological changes in the lungs of CF patients are responsible for these patients susceptibility toward microbial infections. Frequent and repeated airway bacterial infections with pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* (PA) or *Burkholderia cepacia* complex lead to a chronic endobronchial colonization which ensues in an intense neutrophilic inflammatory response [2]. These conditions lead to a life-threatening lung disease in CF patients [3]. While antibiotics are administered to slow down the decline of the pulmonary function and to reduce the frequency and morbidity of pulmonary exacerbations, their efficiency takes the toll in the development of bacteria resistance [4]. This is why there is an urgent need to develop novel and effective ways of therapy (for review see [5]). In addition to efforts in the area of CF gene therapy and corrections of CFTR function, the antimicrobial management—such as CF patient immunization against invading pathogens—is being extensively studied [6]. However, the concept of immunization of CF patients with vaccines derived from PA virulence factors suffers from two shortcomings: (I) the raised anti-pseudomonal immunoglobulins bind PA and therefore induce lung epithelium inflammatory damage; and (II) in general the secretion of immunoglobulins on CF mucosal membranes is impaired [3]. Thus, the passive immunization via non-inflammatory anti-pseudomonal immunoglobulins seems to be a feasible way of preventing PA lung infection [7]. In this respect, chicken yolk antibodies (IgY) provide a great potential in becoming an efficient tool of passive immunization [8]. The most significant advantage of IgY, in contrast to mammalian IgG, consists in their inability to induce inflammatory reaction when binding the antigen. Moreover, the large production of IgY (100 mg/yolk) makes these antibodies well suited for prophylaxis of bacterial infections [9]. Our previous experiments carried out with rats have shown that inhalation of nebulized IgY induced no lung pathology in experimental animals [10]. Because the bacteria adherence to epithelial cells serves as an important initial step in the onset of PA infection, the prophylactic IgY might inhibit this process. In case of CF patients, their airway surfaces lack the sialylation of glycoconjugates such as GM1 [11–13]. That facilitates PA binding and thus increases susceptibility of lungs to PA colonization [14]. Thus, in this study we developed an experimental set-up examining the effect of various compounds on bacteria adhesion to epithelial cells. Since the PA lectin, PAIIL, is considered to be involved in bacteria adhesion on CF airway cells [15], we prepared chicken yolk antibodies against recombinant PAIIL and tested them in this system.

2. Experimental Section

2.1. Antibody Preparation

Antibodies were prepared from egg yolks laid by chickens immunized with recombinant PA lectin, PAIIL, as described elsewhere [9,12]. Pre-immune IgY sample (control) was purified from eggs collected a week prior to the immunization. The presence of anti-PAIIL IgY was determined on ELISA and Western blots using PAIIL and PA lysate as antigens, respectively. The antibody titer was estimated to be 5 µg/mL.

2.2. Cell Staining

Cells were stained with fluorescent PKH dyes (Sigma, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, harvested epithelial cells NuLi or CuFi (immortalized epithelium cell lines derived from normal or CF human lungs, respectively, purchased from ATCC) were washed with PBS, resuspended in Diluent C and incubated for 5 min with an equivalent volume of 4 μ M PKH67 (in Diluent C). Upon that, the staining process was stopped with the addition of FBS (2-fold volume excess) and cells were washed repeatedly with BEGM by centrifugation ($1000\times g$ for 5 min) to remove an excess of the dye. Patient isolate (# ST1763) of *P. aeruginosa* was grown in suspension culture either in minimal mineral medium "M9" (with 0.2% glucose) or in rich medium PS (peptone/casein digest). Bacterial cells were fluorescently labeled with PKH26 as follows: cells at an exponential growth phase were collected, washed with PBS and resuspended in Diluent C to make 6×10^8 CFU/mL. Bacterial suspension was mixed (1:1) with 20 μ M PKH26 (in Diluent C) and incubated for 30 min. To terminate the staining, 2 fold excess of 1% BSA in PBS was added and cells were extensively washed with PBS by repeated centrifugation ($11,000\times g$ for 10 min) to remove excess of the dye.

2.3. Bacterial Adhesion Assay

NuLi or CuFi cells stained with a fluorescent dye PKH67 were seeded (5×10^5 cells/well) onto well plates (24 wells) and incubated for 24 h at 37 °C, 5% CO₂ to form a confluent layer. Bacteria *P. aeruginosa* labeled with PKH26 was pre-incubated for 10 min with antibodies, anti-PAIIL or pre-immune IgY (1 mg/mL), saccharides, L-fucose or D-galactose (1% solution) or PBS and then applied (300 μ L) onto well plates. The input ratio was about 30 bacteria per epithelial cell. After incubation at room temperature (up to 2 h) non-adhered bacteria were removed by extensive washing with PBS. The adhered PA on epithelial cells were quantified fluorometrically using spectrofluorometer Tecan Infinite M200 Pro (excitation (Ex) at 522 nm, emission (Em) at 569 nm). Simultaneously, the fluorescence of epithelial cells was determined (Ex 470 nm, Em 505 nm). Results were expressed as a relative fluorescence ratio PA/NuLi or PA/CuFi. Experimental data were statistically analyzed by SigmaPlot 2000 graphing and statistical analysis software.

3. Results and Discussion

In order to develop a tool for PA prophylaxis preventing bacteria adherence to CF airway epithelial cells, we prepared chicken yolk antibodies against PAIIL. This bacterial lectin is assumed to enhance the PA binding to CF cell glycoconjugates with impaired sialylation [11,15]. ELISA of IgY fractions of yolks confirmed that specific anti-PAIIL IgY was effectively produced in the course of the immunization procedure (not shown). Anti-PAIIL IgYs were further examined on Western blots to prove their binding activity with PAIIL in bacteria lysates. As shown in Figure 1, anti-PAIIL IgY recognized PAIIL both in recombinant sample and in PA lysate. Blots developed with pre-immune IgY showed no reactivity with PAIIL (panel A), thus they served in further experiments as a control IgY. The cultivation of PA in mineral medium "M9" [16] did not significantly induce the production of PAIIL as compared with common medium PS (see Figure 1). This discrepancy might be attributed to

the variability of PA strains, as PA used in our experiments was a clinical isolate ST1763 but not a strain 1244-NP.

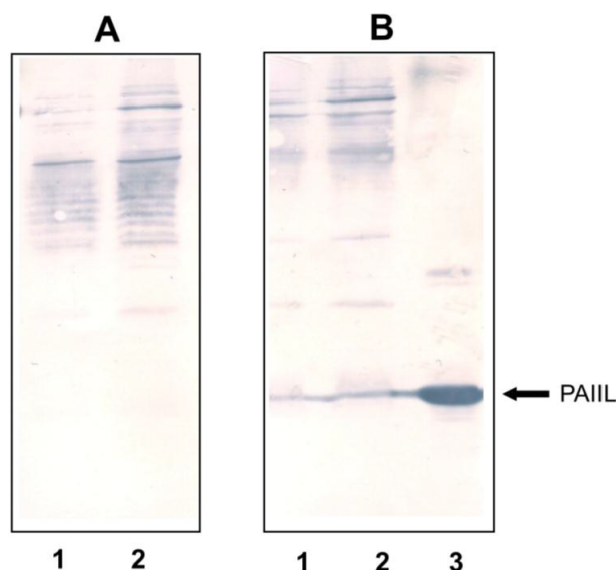


Figure 1. Western blot analysis of *Pseudomonas aeruginosa* lectin (PAIIL). Samples containing PAIIL, cell lysate of PA grown in rich medium PS (line 1) or in minimal mineral medium M9 (line 2) and recombinantly expressed PAIIL (line 3) were separated on reduced 10% SDS PAGE. Separated proteins were electrotransferred onto PVDF membranes and developed with pre-immune IgY (panel A) and anti-PAIIL IgY (panel B) at 30 µg/mL concentrations. The arrow marks the position of PAIIL protein band.

To evaluate anti-PAIIL IgY as a potential tool for PA prophylaxis of CF patients, an *ex vivo* bacterial adhesion assay was developed. The experimental set-up is based on the use of airway epithelium cells adhered on well plates, which were exposed to PA in the presence or absence of anti-PAIIL IgY. The epithelial cell line derived from CF-patient lung tissues (CuFi) was employed to mimic conditions of CF subjects. Cells from airways of a healthy donor (NuLi) were included in the assay for comparison. The precise quantification of adhered PA on epithelial cell monolayer was made possible by labeling the bacteria and epithelial cells with fluorescent dyes. Lipophilic cell tracking PKH dyes are well suited for the assay design as they do not affect cell surface structures important for PA adhesion, show a low impact on the cell viability, and allow a long-term monitoring of cells *in vivo*. Moreover, the fluorescence of PKH26 can be measured without interference with PKH67 dye that is essential for the assay set-up when both cells are simultaneously present in the well. Figure 2 represents micrographs of PA and epithelial cells stained with red fluorescent PKH26 and green fluorescent PKH67 dyes, respectively. Stained CuFi, NuLi and PA cells showed a linear relationship between the number of cells and their relative fluorescence (see Figure 3) which makes the cell quantification possible.

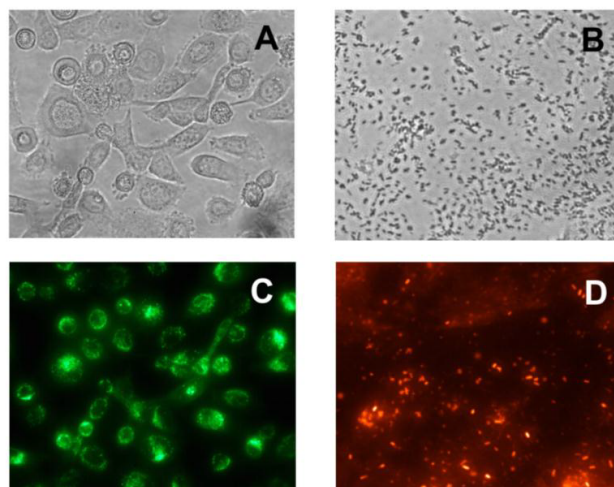


Figure 2. Micrographs of epithelium cells (A, unstained; C, stained with PKH67) and *Pseudomonas aeruginosa* (B, unstained; D, stained with PKH26). Fluorescent cells were examined on a Nikon Eclipse microscope equipped with a filter 31001 FITC C87701 for epithelium cells (PKH67) and filter 31002 RdII C87702 for PA (PKH26).

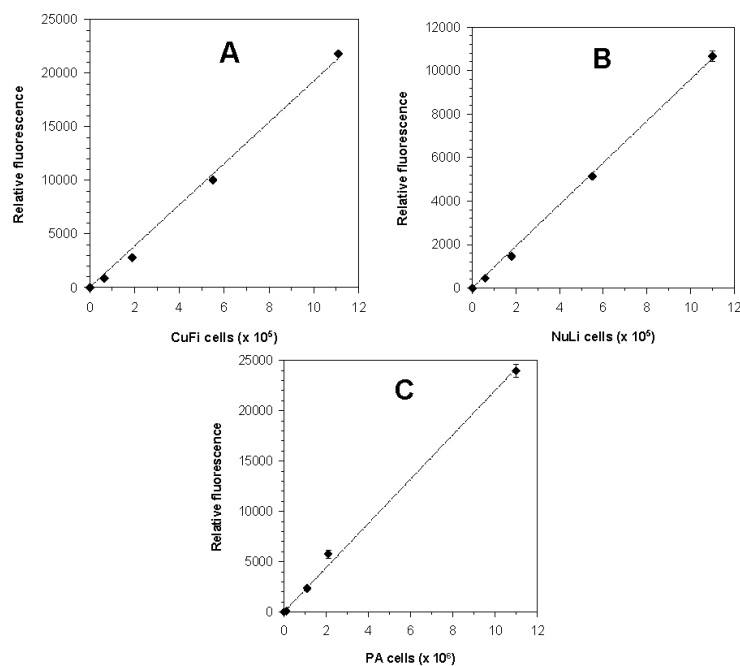


Figure 3. Calibration plots of PKH stained cells. Relative fluorescence of cells was determined on a spectrofluorometer (Tecan Infinite M200 Pro) set for PKH67 (Ex 522 nm, Em 569 nm) and for PKH26 (Ex 470 nm, Em 505 nm). Epithelium cells CuFi and Nuli are shown in plots A and B, respectively. Plot C depicts the calibration line for fluorescently labeled PA. Relative fluorescence of background (blank) was subtracted from that of cell samples. The values are means \pm SD of five independent determinations.

In pilot experiments the length of PA incubation with monolayers of epithelial cells was examined. After the removal of non-adherent bacteria and extensive washing of wells, the number of *P. aeruginosa* associated with epithelial cells was determined. Under the input ratio of about 30 bacteria per epithelial cell the number of bound PA cells increased almost linearly with time during the course of incubation (see Figure 4). The PA adhesion seems to be rather fast as even the momentary exposure of epithelial cells to PA followed by their immediate removal (time 0 in Figure 4) resulted in detectable amounts of retained PA. To gain a readout of relative fluorescence high enough for precise quantification of adhered PA, the 2-h incubation was chosen for further adhesion experiments. These conditions were used to test the efficacy of anti-PAIIL IgY in the PA adhesion assay with both cell lines. Results are expressed as relative fluorescence of PA normalized per number of NuLi/CuFi cells. This arrangement eliminates possible variations caused by differences in the number of cells in monolayers.

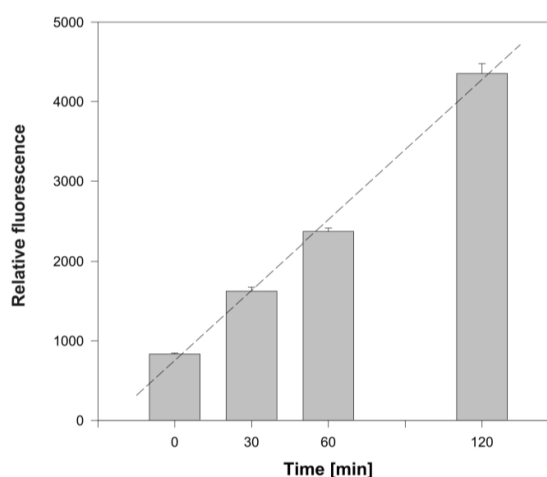


Figure 4. Time course of the PA adherence on an epithelial cell monolayer. Fluorescently labeled PA bacteria (1.5×10^7 CFU) were applied to wells and incubated at room temperature. At distinct time points bacteria were removed and the wells washed with PBS. Adhered PA bacteria were quantified using spectrofluorometer (Tecan Infinite M200 Pro) set for PKH26 (Ex 470 nm, Em 505 nm). Plotted data are means \pm SD of four independent incubations.

As shown in Figure 5, the presence of anti-PAIIL IgY during the PA incubation significantly lowered the number of bacteria associated with either CuFi or NuLi cells (compared to PA treated with PBS only). More profound protecting effect of anti-PAIIL IgY against PA binding ($>50\%$ of PBS control) was observed for CuFi as compared with NuLi cells ($\sim 37\%$ of PBS control). Surprisingly, pre-immune IgY controls (C-IgY, see Figure 5) stimulated the PA association with CuFi and NuLi monolayers. This unexpected effect might be attributed to the agglutination of PA via highly mannoseylated glycoconjugates present on each heavy chain of IgY which bind to lectin PAIIL. Resulting PA aggregates (observed by fluorescent microscope) retain PA in larger numbers in comparison with single bacteria after PBS washings of wells. In the case of anti-PAIIL IgY, the saccharide binding site of PAIIL lectin is blocked by the specific immunoglobulin and thus excluded from the interaction with saccharides of IgY heavy chain. This finding documents not only the ability of anti-PAIIL IgY to bind PAIIL on the

P. aeruginosa surface but also to inhibit PAIIL saccharide binding activity. It is important to note that CF cells (CuFi, see Figure 5) are more susceptible (~30%) to PA adhesion than normal epithelium (NuLi). These data show that the developed *ex vivo* assay system approximates well *in vivo* conditions of CF patients. Moreover, our results provide the evidence that to some extent PAIIL is responsible for *P. aeruginosa* colonization of CF patients.

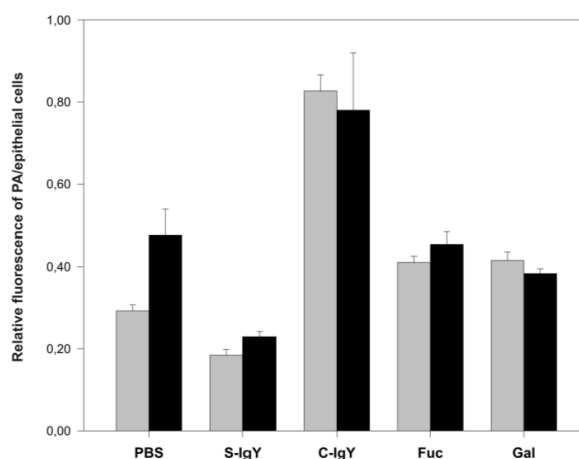


Figure 5. Adhesion of PA to epithelium cells in the presence of IgYs and saccharides. Monolayers of NuLi (grey bars) and CuFi (black bars) were exposed to PA suspension containing anti-PAIIL IgY (S-IgY), pre-immune IgY (C-IgY), L-fucose (Fuc), D-galactose (Gal) or PBS as a control. After a 2-hour incubation non-adhered bacteria were discarded and retained PA and epithelial cells were quantified using spectrofluorometer (Tecan Infinite M200 Pro). Results are expressed as a relative fluorescence ratio of PA/NuLi or PA/CuFi. Plotted data are means \pm SD of four independent incubations.

In fact, the PA adhesion is facilitated by two lectins, PAIL and PAIIL, which bind to saccharides on the surface of airway epithelial cells [15]. Thus, PA lung infection might be also prevented by D-galactose and L-fucose, which compete for the binding sites on PAIL and PAIIL, respectively. While the inhalation of these saccharides reduced the *P. aeruginosa* counts in CF patients [17], in our cellular assay D-galactose and L-fucose failed in the protection of epithelial cells against PA adhesion. In case of CuFi cells, some marginal reduction of PA binding was observed for both saccharides, however, with NuLi monolayers the presence of saccharides significantly increased the bacteria adherence (see Figure 5). This observation might be explained *via in vivo* experiments with mice showing that unmodified sugars, contrary to *i.e.*, Me- α -Gal for PAIL and Me- α -Fuc for PAIIL, inhibit lectin to a lower degree [13]. Although the saccharides were apparently not effective in the inhibition of PA binding, the lower values for CuFi monolayers (compared to NuLi) suggest some competition of applied saccharides and non-sialylated glycoconjugates of CF epithelial cells for the PA lectin binding.

4. Conclusions

The new cellular assay system based on dual fluorescence determination was developed and used to study *P. aeruginosa* adherence inhibition. Herein we report for the first time that chicken yolk antibodies

developed against PAIIL are effective in reducing bacteria adhesion on human airway epithelia cells. Our results suggest that the anti-PAIIL IgY may provide an alternative therapeutical approach in prevention of *P. aeruginosa* infections. The proven anti-PAIIL efficacy of IgYs allows us to extend our research further and examine prophylactic properties of these antibody on animals experimentally infected with PA.

Acknowledgments

The work has been supported by GAUK 1584814 and UNCE 204025/2012.

Author Contributions

This is to state that all co-authors contributed significantly to the presented research article. Libuše Nosková and Lucie Vašková carried out the adhesion tests. Barbora Bláhová and Božena Kubičková prepared and characterized antibodies against PAIIL. Michaela Wimmerová was in charge of PAIIL recombinant expression. Petr Hodek and Marie Stiborová were responsible for the design of experiments, data evaluation, and preparation of figures and for the manuscript writing.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rowe, S.M.; Miller, S.; Sorscher, E.J. Cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 1992–2001.
2. Berger, M. Inflammatory mediators in cystic fibrosis lung disease. *Allergy Asthma Proc.* **2002**, *23*, 19–25.
3. Hartl, D.; Gaggar, A.; Bruscia, E.; Hector, A.; Marcos, V.; Jung, A.; Greene, C.; McElvaney, G.; Mall, M.; Döring, G. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *J. Cyst. Fibros.* **2012**, *11*, 363–382.
4. Döring, G.; Flume, P.; Heijerman, H.; Elborn, J.S. Consensus Study Group. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: Current and future strategies. *J. Cyst. Fibros.* **2012**, *11*, 461–479.
5. Anderson, P. Emerging therapies in cystic fibrosis. *Ther. Adv. Respir. Dis.* **2010**, *4*, 177–185.
6. Høiby, N. Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Med.* **2011**, *9*, doi:10.1186/1741-7015-9-32.
7. Lang, A.B.; Horn, M.P.; Imboden, M.A.; Zuercher, A.W. Prophylaxis and therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and immunocompromised patients. *Vaccine* **2004**, *22*, S44–S48.
8. Carlander, D.; Kollberg, H.; Wejåker, P.E.; Larsson, A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol. Res.* **2000**, *21*, 1–6.
9. Hodek, P.; Trefil, P.; Simunek, J.; Hudecek, J.; Stiborova, M. Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, *5*, 113–124.

10. Hadrabova, J.; Majerova, B.; Cerna, V.; Moserova, M.; Holusa, R.; Mandys, V.; Stiborova, M.; Striz, I.; Hodek, P. Chicken immunoglobulins for prophylaxis: Effect of inhaled antibodies on inflammatory parameters in rat airways. *J. Appl. Biomed.* **2014**, doi:10.1016/j.jab.2014.04.003.
11. Bryan, R.; Kube, D.; Perez, A.; Davis, P.; Prince, A. Overproduction of the CFTR R domain leads to increased levels of asialoGM1 and increased *Pseudomonas aeruginosa* binding by epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1998**, *19*, 269–277.
12. Mitchell, E.P.; Sabin, C.; Šnajdrová, L.; Pokorná, M.; Perret, S.; Gautier, C.; Hofr, C.; Gilboa-Garber, N.; Koča, J.; Wimmerová, M.; *et al.* High affinity fucose binding of *Pseudomonas aeruginosa* lectin PA-III: 1.0 Å resolution crystal structure of the complex combined with thermodynamics and computational chemistry approaches. *Proteins* **2005**, *58*, 735–746.
13. Chemani, C.; Imberty, A.; de Bentzmann, S.; Pierre, M.; Wimmerová, M.; Guery, B.P.; Faure, K. Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 2065–2075.
14. De Bentzmann, S.; Roger, P.; Dupuit, F.; Bajolet-Laudinat, O.; Fuchey, C.; Plotkowski, M.C.; Puchelle, E. Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect. Immun.* **1996**, *64*, 1582–1588.
15. Imberty, A.; Wimmerová, M.; Mitchell, E.P.; Gilboa-Garber, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: Insight into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect.* **2004**, *6*, 221–228.
16. Scharfman, A.; Kroczyński, H.; Carnoy, C.; van Brussel, E.; Lamblin, G.; Ramphal, R.; Roussel, P. Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory mucins and expression of mucin-binding proteins are increased by limiting iron during growth. *Infect. Immun.* **1996**, *64*, 5417–5420.
17. Hauber, H.P.; Schulz, M.; Pforte, A.; Mack, D.; Zabel, P.; Schumacher, U. Inhalation with fucose and galactose for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Int. J. Med. Sci.* **2008**, *5*, 371–376.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3.3. Přiložená publikace č. 3

Evaluation of anti-PAIIL lectin hen yolk antibody as an agent inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence to epithelial cells

Lucie Vašková, Libuše Nosková, Barbora Bláhová, Michaela Wimmerová, Pavel Dřevínek, **Božena Kubíčková**, Marie Stiborová, Petr Hodek

Monatshefte für Chemie, 147:5, 889-896, doi: 10.1007/s00706-016-1687-9 (2016), IF=1,349

Podíl disertantky na prezentované publikaci: Participace na plánování experimentů, práce s buněčnými liniemi a bakteriálními kulturami (fluorescenční značení), participace na provádění adhezních testů, vyhodnocení experimentálních dat a jejich statistické zpracování, participace na interpretaci výsledků.

V této studii jsme se s využitím adhezního testu zaměřili na dvě základní otázky: 1) zdali je produkce anti-PAIIL IgY u různých slepic srovnatelná co do schopnosti protilátek neutralizovat vazbu PAIIL na sacharidové struktury povrchu epiteliálních buněk dýchacích cest a 2) zda jsou různé kmeny *Pseudomonas aeruginosa* stejně citlivé na anti-PAIIL IgY ve vztahu k prevenci jejich adheze. Navíc byl jako možné zjednodušení uspořádání adhezního testu zkoušen i luminiscenční kmen PA-Lux, u kterého není třeba barvení fluorescenčním barvivem PKH26.

Pro produkci anti-PAIIL IgY byly imunizovány dvě slepice Leghorn rekombinantním lektinem PAIIL. Připravené frakce protilátek, jak preimunních, tak cílených na lektin PAIIL, byly analyzovány pomocí tří metod, ELISA, Western blot a adhezního testu. Získané výsledky ELISA testu jasně ukazují, že obě slepice produkovaly poměrně vysoké množství specifických anti-PAIIL protilátek s téměř stejnou imunoreaktivitou. Obdobně i z adhezního testu (obr. 3 v publikaci č. 3, str. 82) je patrná srovnatelná inhibice adheze PA (kmene ST1763) na epiteliální buněčné linie CuFi a NuLi protilátkami anti-PAIIL získaných z vajec obou slepic. V souladu s předchozími výsledky byly buněčné linie CuFi (od pacienta s CF) náchylnější k adhezi PA ve srovnání s NuLi buňkami. Zajímavé výsledky poskytly preimunní IgY (kontrolní) z obou slepic. Preimunní IgY od slepice číslo 2 na rozdíl od slepice číslo 1 byly schopné do určité míry snížit asociaci PA s oběma buněčnými liniemi. Obdobně i výsledky Western blotu a ELISA testu naznačují reaktivitu těchto IgY s PAIIL. Je tedy pravděpodobné, že slepice číslo 2 byla přirozeně vystavena patogenu *Pseudomonas aeruginosa* ještě před imunizací lektinem. Naopak, kontrolní IgY slepice číslo 1 v souladu s výsledky předchozích experimentů (viz obr. 5 v publikaci č. 2, str. 72) zvýšily adhezi PA k buněčné linii NuLi. Lze shrnout, že u kontrolních IgY je pozorována velká variabilita v ovlivnění adheze PA na epiteliální buňky v závislosti na jednotlivých slepicích a jejich přirozeném kontaktu s okolními patogeny. V případě produkce specifických protilátek, anti-PAIIL IgY, je však slepice vhodným a spolehlivým organismem.

Abychom získali více informací o profylaktickém potenciálu anti-PAIIL IgY proti infekcím vyvolaných různými kmeny PA, zařadili jsme do testování adheze další čtyři kmeny izolované z pacientů s CF (ST996, 1003, 1022 a PA-CF) a sbírkový kmen PA01. Pro možné využití kmene PA-Lux, který by v adhezním testu nahradil dosud využívaný kmen ST1763 byl do screeningu kmenů zahrnut i tento luminiscenční kmen. Z protilátkových frakcí, které jsme měli k dispozici, byla zvolena anti-PAIIL IgY produkovaná slepicí č. 1. Ze získaných dat na obrázku 6 (publikace č. 3, str. 84) je patrné,

že adheze všech testovaných kmenů PA byla výrazně snížena protilátkami anti-PAIIL IgY ve srovnání s kontrolou, kdy byl použit jen PBS. Rozdíly v hodnotách těchto dvou sad výsledků (anti-PAIIL IgY vs. PBS) byly ve většině případů statisticky významné (na hladině významnosti $P < 0,001$). V souladu s našimi předchozími výsledky se některé testované kmeny PA přednostně vázaly na plicní buněčné linie CuFi, zatímco u jiných kmenů nebyly patrné rozdíly mezi oběma buněčnými liniemi.

Zajímavé výsledky s odlišnými trendy od ostatních testovaných kmenů poskytl bakteriální izolát pacienta s CF, kmen ST966. Bakterie zmíněného kmene, které nebyly ovlivněné protilátkami, se na CuFi buněčné linie vázaly nejvíce ze všech analyzovaných kmenů, zároveň specifické protilátky anti-PAIIL IgY měly v tomto jediném případě menší protektivní vliv na adhezi než preimunní IgY, které významně redukovaly asociaci ST966 s epiteliálními buňkami. Je pravděpodobné, že směs preimunních polyklonálních protilátek (od slepice 1) obsahovala i další IgY proti ostatním adhesinům PA zabraňující vazbě kmene ST966. Zdá se, že tento kmen PA využívá k vazbě na epiteliální buňky kromě lektinu PAIIL některé z dalších virulenních faktorů, jako jsou bičíky, pili, anebo lektin PAIL, který je dalším kandidátem na přípravu profylaktických protilátek IgY.

Experimentální uspořádání adhezního testu bylo dosud založeno na měření duální fluorescence epiteliálních a bakteriálních buněk, značených fluorescenčními barvivý PKH. Za těchto podmínek je možno z poměru fluorescence bakterií a epiteliálních buněk získat normalizovaná data odrážející počet adherovaných bakterií PA na epiteliální buňky. Jednou z možností, jak test zjednodušit, je místo PA kmene, který je třeba značit fluorescenčním barvivem, využít luminiscenční kmen PA-Lux, jež umožňuje tento krok vynechat. Získaná data budou pak vyjádřena poměrem luminiscence bakteriálních buněk na fluorescenci epiteliálních buněk. Bakteriální luminiscenční kmen PA-Lux obsahuje gen *luxCDABE* pro expresi enzymu luciferasy, který v přítomnosti ATP přeměňuje luciferin na oxyluciferin za současného uvolnění světelného kvanta. Kmen PA-Lux byl již využit např. při screeningu antimikrobiální aktivity peptidů ve studii Hilpert a Hancock (2007). Abychom porovnali tato dvě experimentální uspořádání adhezního testu, analyzovali jsme následující varianty: kmen PA-Lux byl značen fluorescenčním barvivem PKH26, následně byla stanovena buď fluorescence nebo luminiscence, anebo nebyl ošetřen barvivem a byla měřena pouze luminiscence adherovaných bakterií. Výsledky shrnuté na obrázku 5 (publikace č. 3, str. 83) jasně ukazují, že vynesená data ze všech tří variant jsou srovnatelná a udržují stejný trend ve sledovaných parametrech. Především specifické protilátky anti-PAIIL IgY vykazovaly (stejně jako u původně

užívaného kmene ST1763) profylaktický účinek vůči adhezi i v případě luminiscenčních PA-Lux. Preimunní IgY shodně u obou bakteriálních kmenů způsobily zvýšení retence bakteriálních buněk, díky již zmíněné agregaci prostřednictvím Fc fragmentů IgY. A v neposlední řadě, v souladu s předchozími experimenty s kmenem ST1763, i v případě PA-Lux, byly CuFi buněčné linie citlivější k bakteriální adhezi ve srovnání s NuLi buňkami. Srovnáním hodnot luminiscence značeného a neznačeného kmene PA-Lux bylo tak potvrzeno, že samotné barvivo neovlivnilo životaschopnost PA a ani manipulace s bakteriálními buňkami při procesu barvení (opakovaná centrifugace a resuspendace) neměla vliv na jejich adhezi na epitelální buňky. Lze tedy předpokládat, že virulenní faktory jako bičík nebo pili (Hawdon a kol. 2010), které by mohly být během procesu značení PA poškozeny či částečně odděleny, nejsou v našem adhezním testu rozhodující pro vazbu PA, naopak k adhezi významně přispívají pevněji vázané struktury, námi studovaný lektin.

Závěrem je možno shrnout odpovědi na v úvodu položené otázky následovně: 1) specifické protilátky proti lektinu PAIIL získané od dvou různých slepic byly při inhibici adheze PA na epitelální buňky srovnatelně účinné a 2) většina testovaných kmenů PA vykazovala v přítomnosti anti-PAIIL IgY sníženou schopnost adheze na plicní buněčné linie CuFi a NuLi.



Evaluation of anti-PAIIL lectin hen yolk antibody as an agent inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence to epithelial cells

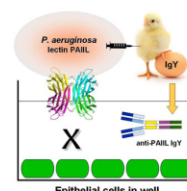
Lucie Vašková¹ · Libuše Nosková¹ · Barbora Bláhová¹ · Michaela Wimmerová² · Pavel Dřevínek³ · Božena Kubíčková¹ · Marie Stiborová¹ · Petr Hodek¹

Received: 9 November 2015 / Accepted: 31 January 2016 / Published online: 22 February 2016
© Springer-Verlag Wien 2016

Abstract Hen yolk antibody (IgY) against *Pseudomonas aeruginosa* (PA) virulence factor, lectin PAIIL, was prepared from two hens. As judged from ELISA, both animals produced equally reactive anti-PAIIL antibodies. The IgY prophylaxis against adhesion of PA on epithelium cell lines derived from normal or cystic fibrosis (CF) human lungs was examined. Both anti-PAIIL antibodies comparably prevented PA adherence on epithelial cells. In accordance with clinical data, cells from CF patient showed higher susceptibility to PA binding compared to cells of a healthy subject. In additional experiments, a luminescent PA strain (PA-lux) was used in the PA adhesion assay instead of an originally used regular PA strain (ST 1763). The employment of PA-lux in the assay is advantageous since the bacteria do not need to be fluorescently labeled for their quantification. The application of both non-luminescent PA (ST 1763) and newly tested PA-lux strains provides consistent results as far as the anti-PAIIL IgY protection against of PA adherence is concerned. Furthermore, in lung epithelium adherence assay we examined also other PA strains for their sensitivity to anti-PAIIL antibody. The adherence of all PA strains tested was reduced by anti-PAIIL antibody when compared with un-affected controls.

This finding suggests a wide applicability of anti-PAIIL antibody in prophylaxis of PA lung infections.

Graphical abstract



Keywords Receptors · Glycoproteins · Fluorescence spectroscopy · Dyes · Antibacterial antibody

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disorder caused by mutations of the gene coding for CF transmembrane conductance regulator (CFTR) protein [1]. Because of changes in their lungs, CF patients are susceptible to airway microbial infections caused by pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Their infections usually turn to be of chronic nature with endobronchial localization, and they are the most common life-shortening disorder of CF patients. The treatment of bacterial infections with antibiotics is frequently ineffective because of a bacterial resistance or biofilm formation [2]. To prevent the morbidity and mortality of CF patients from bacterial infections there is a critical need to find new effective therapies [3]. While the CF gene therapy and modulators of CFTR function are studied [4], the CF

✉ Petr Hodek
hodek@natur.cuni.cz

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Hlavova 8, 128 40 Prague 2, Czech Republic

² Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Czech Republic

³ Department of Medical Microbiology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague and University Hospital Motol, V Úvalu 84, 150 06 Prague 5, Czech Republic

patient immunization against pathogens is being examined, too [5]. The protection of CF patients immunized against bacterial virulence factors seems to be in part limited by impaired adaptive immunity in CF airways and cleavage of protective immunoglobulins (IgA) by elastase [6]. Moreover, produced antibodies are usually with low avidities and not protective [7]. There have been various attempts to generate human or humanized monoclonal antibodies against virulence factors of PA for bacterial prophylaxis of CF patients [8]. However, when specific IgGs are administered and bound with pathogenic bacteria, inflammatory reactions might be initiated. This process possibly causes detrimental changes of already burden in lung epithelium [9]. Apparently, the passive immunization should be performed via immunoglobulins, which do not trigger the inflammation. Besides specifically engineered mammalian IgG lacking the pro-inflammatory properties, unmodified hen yolk antibody (IgY) is well suited for this purpose. In contrast to mammalian IgG, the yolk antibody does not induce inflammatory reaction when the complex with antigen is formed [10]. A Swedish group tested anti-*P. aeruginosa* IgY [11] as a prophylactic gargle for the cohort of CF patients [12]. Our previous experiments have shown that even the inhalation of nebulized IgY does not induced any pathology in lungs of experimental rats [13]. Likewise, the exposure of human lung epithelium cells with IgY in medium did not elicit any significant production of pro-inflammatory cytokines [14]. IgYs have been successfully used for passive immunization against various infectious diseases. For instance, yolk immunoglobulins against rotavirus antigen and fimbrial adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli* protected piglets from life-threatening diarrhea [15]. Similarly, anti-venom hen egg immunoglobulins were effective in the neutralization of snake venom. The administration of IgY against venom of *Walterinnesia aegyptia* prevented the mortality of an experimentally bitten mice [16].

It has been reported that low sialylation of epithelial cell membranes is a critical factor associated with the susceptibility of CF airways to PA infection [17]. Two PA lectins, PAII and PAIII, showing high binding affinity for D-galactose and L-fucose, respectively, react with undersialylated glycoproteins and glycolipids exposed on cell surface [18]. Since the PA lectin, PAIII, is considered to be largely involved in the bacterial adhesion on CF airway cells, we prepared hen yolk antibody against recombinant PAIII [19] and proved that this anti-PAIII antibody reduced the bacterium adhesion to epithelial cells [20]. In this paper, we report the protective effect of anti-PAIII antibodies produced in two hens, and the impact of this antibody on different PA strains.

Results and discussion

Although hen egg yolks have been recognized as an abundant source of highly specific antibodies more than three decades ago, their wide variety of applications occurs only recently. Enormous antibody production (70–100 mg of IgY per yolk) predetermines them to be used for prophylaxis purposes [21]. IgYs as a passive immunization against viral and bacterial infections have been successfully tested in animal studies. Moreover, two clinical trials are running with IgYs. Water soluble fractions of yolks containing IgY against *P. aeruginosa* flagella are used as a gargle to prevent PA lung infections of CF patients [22, 23]. Since the PA infection is started in lungs, our research is focused on the inhalation of specific IgYs towards a lower respiratory tract [13]. Of several PA virulence factors to be neutralized via antibody prophylaxis we selected lectin PAIII, which is a specific PA adherence factor for lung epithelium of CF patients [17, 18].

That is why in this paper we focused on anti-PAIII IgY and addressed two basic questions: first, are the hens comparable in the production of yolk antibodies neutralizing the saccharide binding ability of the lectin; second, are various *P. aeruginosa* strains equally susceptible to anti-PAIII IgY in the respect of preventing their adherence on airway epithelial cells? To evaluate the efficacy of anti-PAIII IgY in prevention of PA binding to epithelial cells, we used previously developed PA adherence assay, scheme of which is shown in Fig. 1 [20]. In addition, to simplify our adherence assay a luminescent PA strain (PA-lux) was tested.

Preparation and characterization of anti-PAIII IgYs

Two white Leghorn hens were immunized with PAIII antigen and IgY fractions (1 and 2) were prepared from six eggs collected between day 45 and 55 of the immunization scheme. IgY samples were examined on ELISA coated with PAIII as an antigen. Data in Fig. 2 clearly show that both hens produced anti-PAIII IgYs of almost equal immunoreactivity. Moreover, a non-proportional increase in readings between two antibody concentrations used (3.3 and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) suggests that the antigen was nearly saturated with the antibody; in other words, the prepared antibody fractions contain a rather high amount of anti-PAIII IgYs.

Next, the anti-PAIII and corresponding pre-immune IgYs were tested in the PA adherence assay using strain ST 1763. Likewise in ELISA, both anti-PAIII IgYs in a comparable manner prevented PA adherence on CuFi and NuLi cells (see Fig. 3). In line with clinical data, CuFi

Fig. 1 Scheme of bacteria adherence experiment. NuLi or CuFi cells (immortalized epithelium cell lines from normal or CF human lungs, respectively) were stained with a fluorescent dye PKH67 and seeded onto well plates. *P. aeruginosa* (PA) either bioluminescent (PA-lux) or stained with a fluorescent dye PKH26 in mixture with anti-PAIIL or control antibodies was incubated for 2 h with NuLi/CuFi cells in wells

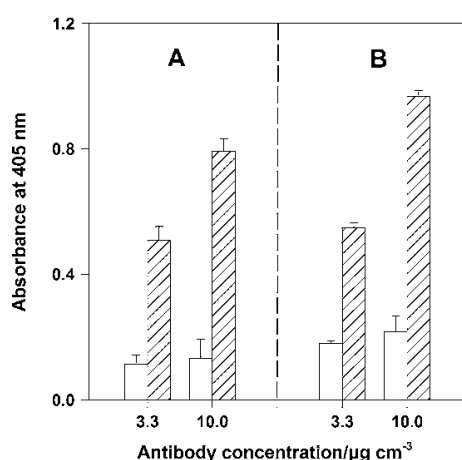
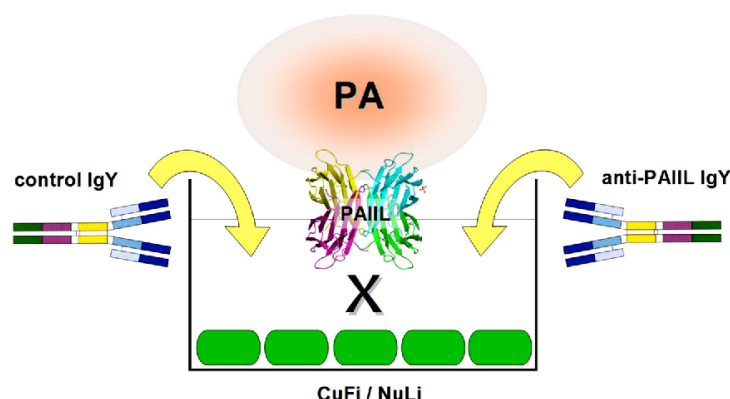


Fig. 2 Comparison of anti-PAIIL IgYs in ELISA. Using a recombinantly prepared PAIIL as an antigen pre-immune IgYs (blank bars) and anti-PAIIL IgYs (hatched bars), prepared of eggs, laid by hen 1 (A) and 2 (B), were examined. Immunoreactivity of IgY fractions in two concentrations (3.3 and 10 μg/cm³) is expressed as the absorbance of *p*-nitrophenol produced by alkaline phosphatase secondary antibody conjugate

epithelial cells from CF patient were more susceptible to bacteria adhesion than those derived from healthy subject (NuLi). Interestingly, control IgY from hen 1 contrary to that from hen 2 was able to some extent reduce PA binding. All IgY fractions were further examined on Western blots containing PA cell lysate. In accordance with the results of an adhesion assay, both anti-PAIIL IgYs (1 and 2) developed lectin bands on the membrane (see Fig. 4). Moreover, control (pre-immune) IgY 2 also reacted with PA lectin. This finding reflects a possibility that hen 2 was naturally exposed to *P. aeruginosa* before its immunization. On the other hand, control IgY 1 to some extent increased *P. aeruginosa* retention on epithelial cells. As IgY is a glycoprotein possessing highly mannosylated saccharide

structures, which are specific for PAIIL binding [24], a saccharide-mediated IgY-lectin complex may be formed. The resulting PA agglutination (aggregation) via IgYs decreases the efficiency of washing out of bacteria. Similar PA aggregation by pre-immune IgY has been recently reported by Thomsen et al. in vitro [25]. This interaction is, however, much weaker than that between anti-PAIIL IgY and the lectin in an antibody-antigen complex.

It is possible to conclude that the hen is a reliable organism for the anti-PAIIL production.

Application of luminescent PA-lux in bacteria adherence assay

The PA adherence assay is based on the dual fluorescence determination of retained PKH26-labeled bacterial cells and PKH67-labeled epithelial cells attached to wells [20]. This set-up allows to calculate a fluorescence ratio (bacteria:epithelial cells) and thus obtain normalized data reflecting number of adhered PA. Luminescent *P. aeruginosa* (PA-lux) expressing the luxCDABE (luciferase) gene cassette, which has been used for screening of anti-microbial activity of peptides [26], was introduced in our assay to avoid the bacterium staining prior to its use. We examined three experimental settings of the PA adherence assay: PA-lux was either used without any treatment followed by its luminescence determination or stained with the PKH67 dye and then the luminescence or fluorescence of retained bacteria was measured. Results of this experiment are shown in Fig. 5. Despite the fact that not all determined changes are statistically highly significant, plotted data follow the same trends. Regardless, the protocol used data are very much comparable among the settings and consistently confirm the protective effect of anti-PAIIL IgY against the bacteria adherence. Moreover, in agreement with previous experiments when PA strain (ST 1763) was used, CuFi cells were more sensitive to PA-

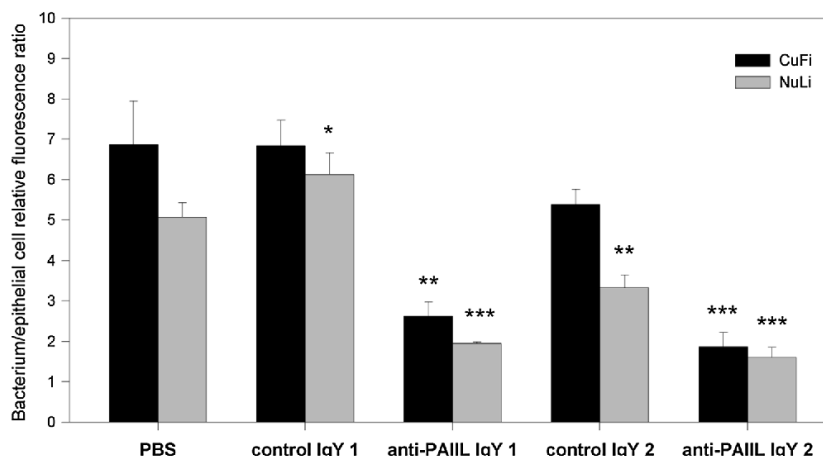


Fig. 3 Comparison of anti-PAIIL IgYs in PA adherence assay. PA and epithelial cells were stained with fluorescent dye PKH26 and PKH67, respectively. Monolayers of CuFi (black bars) and NuLi (grey bars) were exposed to PA suspension containing anti-PAIIL IgY or pre-immune IgY of hen 1 and 2, or PBS as a control. After 2-h incubation, non-adhered bacteria were discarded and both adhered PA

and epithelial cells were quantified using dual spectrofluorometer. Results are expressed as an arbitrary relative fluorescence ratio of PA/NuLi or PA/CuFi. Plotted data are mean \pm SD of four independent incubations. Data comparison with respective PBS-treated PA control was performed by *t* test analysis: **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001

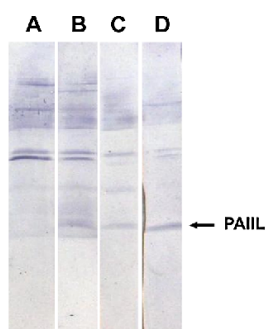


Fig. 4 Western blot analysis of PAIIL. Samples of cell lysate of PA containing PAIIL were separated on reduced 15 % SDS PAGE. Separated proteins were electrotransferred onto PVDF membranes and developed with pre-immune IgY (panels A, C) or anti-PAIIL IgY (panels B, D) prepared of eggs laid by hen 1 (panels A, B) and hen 2 (panels C, D). The arrow marks the position of PAIIL protein band

lux binding that NuLi cells. Surprisingly, the pre-incubation of PA-lux with control IgY yielded an increased bacteria retention. Similar trend was also found when this control IgY (pre-immune IgY of hen 1) was used in the assay with PA (ST 1763) (see Fig. 4; Ref. [20]).

Since the PA-lux luminescence is closely connected to microbial metabolism, we were able to ascertain that bacteria staining with PKH67 dye did not affect the bacterium viability (see Fig. 5). Moreover, when comparing the luminescence and fluorescence data, it is obvious that bacteria handling (repeated centrifugations and resuspensions) during PA labeling and the presence of PKH67

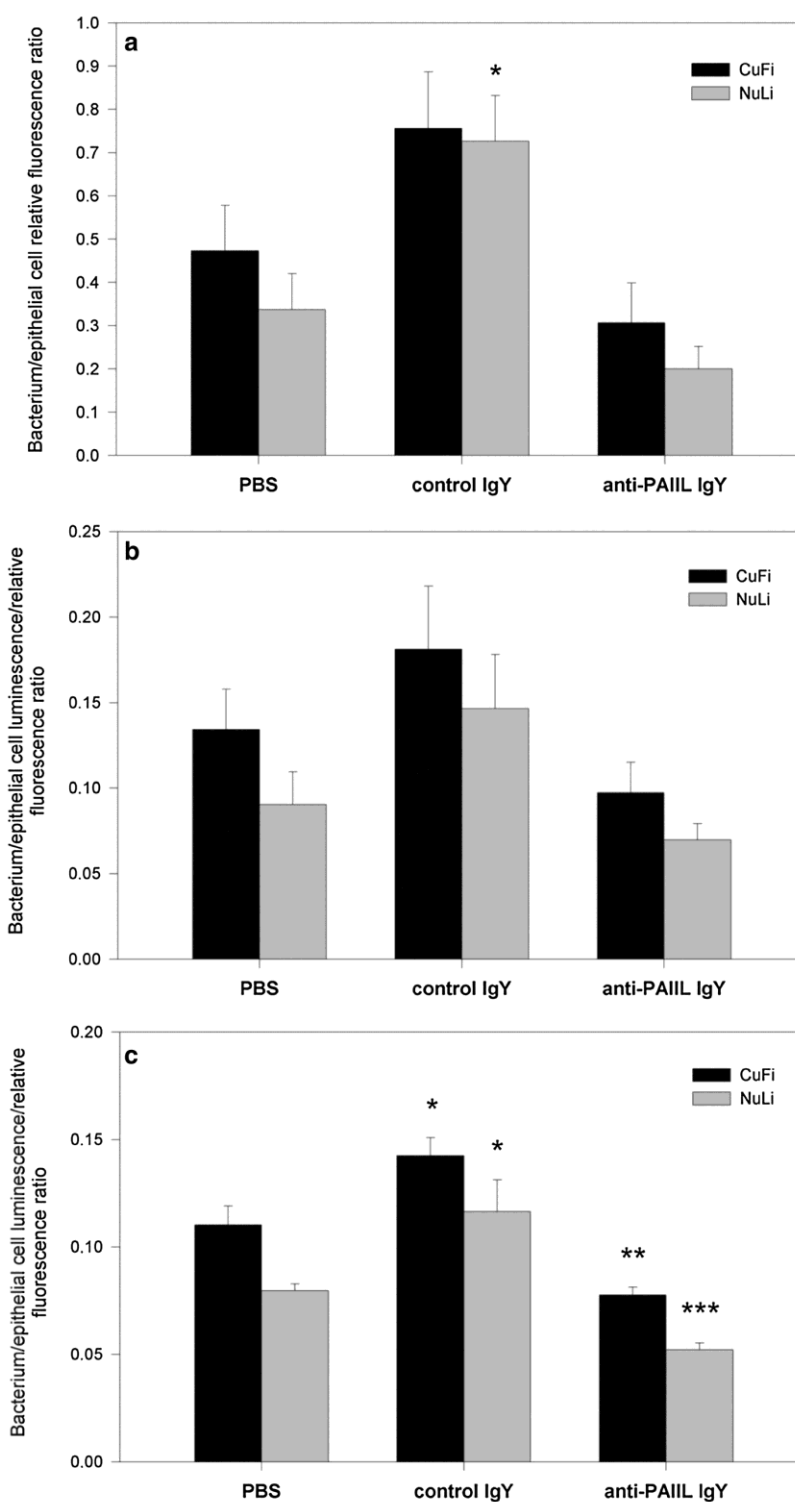
dye itself did not change PA adherence on epithelial cells. This suggests that fragile virulence factors such as flagella and fimbriae [27, 28], which could be partially lost in the course of bacteria staining, are not decisive adherence factors in our assay. Thus, tightly bound virulence factors (e.g. lectins) were prevailing in the bacteria adherence.

Taking together, the application of PA-lux was successful and allowed us to validating the PA adherence assay.

Screening of PA strains in the adherence assay

To extend our knowledge on a prophylactic potential of anti-PAIIL antibody against *P. aeruginosa* infections, additional bacterium isolates of CF patient were tested in the further study. In particular, we chose to use four patient PA strains (ST 966, 1003, 1022, and PA-CF) and strain PA01 (ST 549) from the Collection (CCM, Brno). To get the whole figure PA-lux and PA ST 1763 were included, too. For the screening of these PA strains, the anti-PAIIL antibody produced with hen 1 was used. Data displayed in Fig. 6 indicate that the majority of PA strains were sensitive to anti-PAIIL antibody. The adherence of all PA strains tested was markedly reduced by anti-PAIIL antibody when compared with un-affected (PBS) controls; the differences were mostly statistically highly significant. With the exception of PA strain ST 966, in all other cases the anti-PAIIL antibody (relative to control IgY) lowered bacteria binding on both types of epithelial cells. In accordance with our previous data, several PA strains

Fig. 5 Adherence of PA-lux on epithelium cells. Results are expressed as an arbitrary relative fluorescence ratio of PA/NuLi or PA/CuFi. Epithelium cells CuFi (black bars) or NuLi (grey bars) were stained with PKH67. Bacteria PA-lux were either stained with dye PKH26 (panels a, b) or were not treated (c). The adherent bacteria were then quantified by fluorescence (a) or by luminescence determination (panels b, c). Plotted data are mean \pm SD of four independent incubations. Data comparison with respective PBS-treated PA control was performed by *t* test analysis: **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001



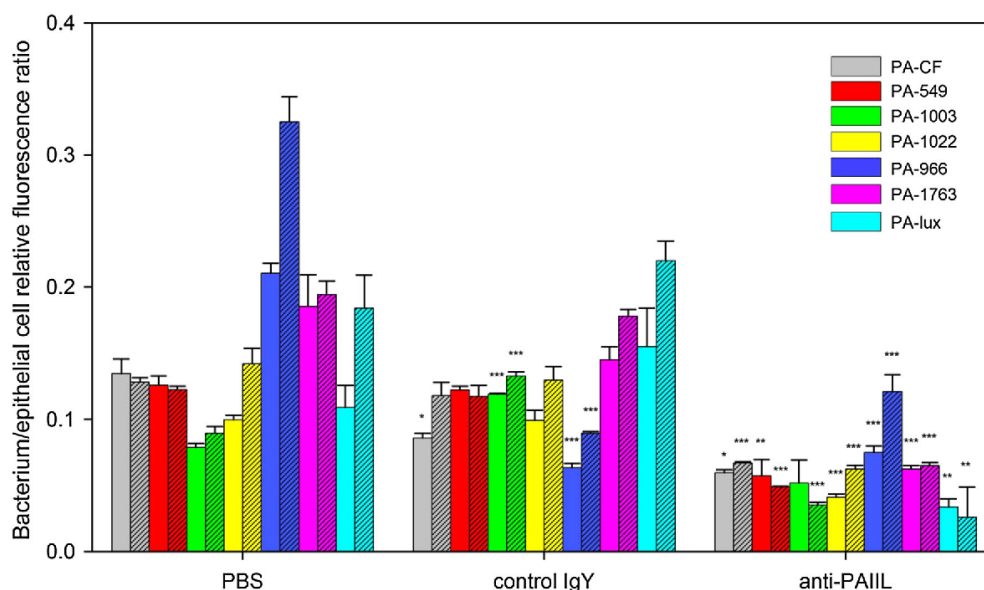


Fig. 6 Assessment of anti-PAIIL IgY against PA strains. PA of different strains and epithelial cells was stained with fluorescent dye PKH26 and PKH67, respectively. Monolayers of NuLi (plain bars) and CuFi (hatched bars) were exposed to PA suspensions containing anti-PAIIL IgY, pre-immune IgY or PBS as a control. After 2-h incubation non-adhered bacteria were discarded, and adhered PA and

epithelial cells were quantified using dual spectrofluorometer. Results are expressed as an arbitrary relative fluorescence ratio of PA/NuLi or PA/CuFi. Plotted data are mean \pm SD of four independent incubations. Data comparison with respective PBS-treated PA control was performed by *t* test analysis: **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001

preferably bind to CF cells while others did not distinguish between CuFi and NuLi cells.

PA strain ST 966 showed a quite different binding pattern in the assay. While un-affected bacteria (PBS controls) most extensively (of all strains) adhered namely to CF cells, the anti-PAIIL IgY was less efficient in the protection of epithelial cells against PA binding than the control antibody (see Fig. 6). Apparently, this PA strain employs some other virulence factor(s) for its binding to epithelium cells than lectin PAIIL. A significant decrease of PA adherence (compared to PBS control) suggests that the hen used for anti-PAIIL IgY production developed also some other antibody preventing the PA binding. In addition to flagella and fimbria, the other PA lectin, PAII, significantly contributes to PA virulence. This lectin is a candidate bacterium adhesin for preparation of next prophylactic hen yolk antibodies.

Similarly to results shown in Fig. 5a, data plotted for PA strains ST 1003 and PA-lux in Fig. 6 indicate that the control IgY increased the amount of retained PA on epithelial cells above the level detected for PBS-treated bacteria. As discussed above, this phenomenon is likely caused by the interaction of control antibody with PA bacterium via IgY saccharide structures. Thus, it is important to note that the dose of prophylactic antibody

should contain enough of anti-PAIIL IgY to assure an inhibition of PAIIL saccharide binding; otherwise, IgYs may potentiate bacteria retention on epithelium that leads to detrimental consequences.

Conclusion

Specific yolk antibodies arisen against *P. aeruginosa* lectin PAIIL by two hens proved to be equally effective in reducing bacteria adhesion on epithelial cells. *P. aeruginosa* bio-luminescent ST 549 (PALux) strain was sensitive to the anti-lectin PAIIL antibodies and allowed to validate the PA adherence assay. In addition, we demonstrate that hen yolk anti-PAIIL antibody effectively protected human airway epithelia cells against adhesion of majority of tested PA strains.

Experimental

Chemicals and materials

Rabbit IgG anti-chicken IgY alkaline phosphatase conjugate and PKH dyes, 26 and 67, were from Sigma

Chemical Co. (USA); *p*-nitrophenyl phosphate, SDS, Tween 20, ovalbumin from Serva (Germany), PAGE Ruler Broad Range protein standard from Thermo Fisher Scientific (CR). All other chemicals were of reagent grade and were purchased from Lachema (CR). Immortalized epithelium cell lines derived from normal (NuLi) or CF human (CuFi) lungs were purchased from ATCC (Poland). Luminescent strains of *P. aeruginosa*, PA-lux (Sequence Type (ST) 549), were a generous gift of Dr. Robert E. W. Hancock, University of British Columbia, Vancouver (Canada). CF PA strains (ST 966, 1003, 1022, 1763 and PA-CF) were from University Hospital Motol (Prague, Czech Republic) and a collection strain PA01 (ST 549) from the Czech Collection of Microorganisms (Brno, Czech Republic).

Antibody preparation

Antibodies were prepared from egg yolks laid by hens immunized with *P. aeruginosa* surface lectin PAIIL. The lectin antigen was expressed in *E. coli* [29]. The recombinant lectin PAIIL purified to homogeneity was injected to hens as described elsewhere [19, 20]. Pre-immune IgY sample (control) was purified from eggs collected a week prior to the hen immunization. The anti-PAIIL IgY preparations were characterized with ELISA and Western blots for the presence of specific antibodies.

ELISA

The immunoreactivity of IgY against lectin PAIIL was tested by ELISA. An ELISA plate (Nunc-Polysorp, Denmark) was coated with 100 mm³ of antigen solution (PAIIL 4 µg/cm³ in 50 mM sodium carbonate buffer, pH 9.6) per well and incubated at 4 °C overnight. After washing 3 times with PBS containing 0.05 % Tween 20 (PBS-Tw), each well was loaded with 150 mm³ of 2 % solution of ovalbumin in PBS-Tw and incubated for 1 h at 37 °C. Wells were washed (3 times) with PBS-Tw and then loaded with 100 mm³ of antibody solution in PBS (dilutions up to 1:1000) in duplicate samples. After washing (3 times) with PBS-Tw, 100 mm³ of alkaline phosphatase-conjugated rabbit IgG anti-chicken IgY in PBS was added to each well (10,000 times diluted commercial preparation) and incubated at 37 °C for 1 h. After washing with PBS-Tw, 100 mm³ of substrate solution (1 mg/cm³ *p*-nitrophenyl phosphate in 0.1 M carbonate buffer pH 10 containing 1 mM MgCl₂) was added and the plate kept for 10 min at room temperature in dark. Reaction was stopped by the addition of 100 mm³ 2 mol/dm³ NaOH to each well and the absorbance was measured at 405 nm using ELISA reader Sunrise (Tecan).

Western blots

The isolated IgYs were examined by Western blotting on Immobilon-P membrane (Millipore, Bedford, MA) as described earlier [30]. PA cell lysates in reduced buffer were applied onto SDS-containing 15 % polyacrylamide separation gel [31]. The blot after electrotransfer was blocked in a solution of 5 % skim milk in PBS containing 0.3 % Triton X-100 (PBS-TM) over night. The membrane was incubated with anti-PAIIL IgY (20 µg/cm³ of PBS-TM) for 2 h and after washing with PBS-TM, incubated with alkaline phosphatase-conjugated rabbit IgG anti-chicken IgY in PBS-TM (10,000 times diluted commercial preparation) for 1 h. Protein bands were visualized with the alkaline phosphatase substrate, BCIP/NBT tablet.

Epithelial cell staining

Airway cells were stained with fluorescent PKH dyes according to the manufacturer's protocol. In brief, cells NuLi or CuFi were washed with PBS, resuspended in diluent C and incubated (5 min) with an equivalent volume of 4 µM PKH67 (in diluent C). Then, the staining process was stopped with the addition of FBS (twofold volume excess) and cells were washed repeatedly with BEGM medium by centrifugation (1000g for 5 min) to remove an excess of the dye.

Bacteria cell staining

Pseudomonas aeruginosa was grown in suspension culture in PS medium (peptone/casein digest). Tested bacterial cells were fluorescently labeled with PKH26 as already described [20]. The bacteria at an exponential growth phase were collected, washed with PBS and resuspended in diluent C to make 6 × 10⁸ CFU/cm³. The cell suspension was mixed (1:1) with 20 µM PKH26 (in diluent C) and incubated for 30 min. To terminate the staining, twofold excess of 1 % BSA in PBS was added and cells were extensively washed with PBS by repeated centrifugation (11,000g for 10 min) to remove an excess of the dye.

Assay of bacterial adhesion on epithelial cells

The assay was performed according to Noskova et al. [20]. Immortalized epithelium cell lines NuLi or CuFi stained with fluorescent dye PKH67 were seeded onto well plates (24 wells) and incubated for 24 h at 37 °C, 5 % CO₂ to form a confluent layer. Bioluminescent PA-lux or PKH26 stained bacterial suspensions were pre-incubated for 10 min with antibodies, anti-PAIIL or pre-immune IgY (1 mg/cm³), or with PBS, and then applied onto the well plates. After 2-h incubation non-adhered bacteria were

removed by extensive washing with PBS. The adhered PA cells on epithelial cells were quantified (Ex 522 nm, Em 569 nm for PA; Ex 470 nm, Em 505 nm for NuLi/CuFi, or measuring the PA luminescence) using spectrofluorometer (Tecan Infinite M200 Pro). Results were expressed as a relative fluorescence ratio PA/NuLi or PA/CuFi as well as the PA luminescence/epithelium cell fluorescence. For statistical data analysis, we used Student's *t* test. All *P* values are two-tailed and considered significant at the 0.05 level.

Acknowledgements The work has been supported by the Grant Agency of the Charles University (GAUK) 1584814 and University Research Center (UNCE) 204025/2012.

References

- Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ (2005) *N Engl J Med* 352:1992
- Döring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS (2012) *J Cyst Fibros* 11:461
- Anderson P (2010) *Ther Adv Respir Dis* 4:177
- Kuk K, Taylor-Cousar JL (2015) *Ther Adv Respir Dis* 9:313
- Döring G, Pier GB (2008) *Vaccine* 26:1011
- Berger M (2002) *Allergy Asthma Proc* 23:19
- Ciofu O, Petersen TD, Jensen P, Høiby N (1999) *Thorax* 54:141
- Lang AB, Horn MP, Imboden MA, Zuercher AW (2004) *Vaccine* 22:S44
- Dhooghe B, Noël S, Huaux F, Leal T (2014) *Clin Biochem* 47:539
- Carlander D, Kollberg H, Wejåker PE, Larsson A (2000) *Immunol Res* 21:1
- Nilsson E, Amini A, Wretling B, Larsson A (2007) *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 856:75
- Nilsson E, Larsson A, Olesen HV, Wejåker PE, Kollberg H (2008) *Pediatr Pulmonol* 43:892
- Hadravová J, Majerová B, Černá V, Moserová M, Holuša R, Mandys V, Stiborová M, Stříž I, Hodek P (2015) *J Appl Biomed* 13:19
- Kubičková B, Majerová B, Hadravová J, Nosková L, Stiborová M, Hodek P (2014) *Neuro Endocrinol Lett* 35:S99
- Hennig-Pauka I, Stelljes I, Waldmann KH (2003) *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 110:49
- Moussa IM, Hessian AM, Al-Arfaj AA, Salem-Bekhit MM, Alrejai SA (2012) *Saudi Med J* 33:846
- Dosanjh A, Muchmore EA (2009) *Open Respir Med J* 3:79
- Kirkeby S, Wimmerová M, Moe D, Hansen AK (2007) *Microbes Infect* 9:566
- Hodek P, Trefil P, Šimůnek J, Hudeček J, Stiborová M (2013) *Int J Electrochem Sci* 8:113
- Nosková L, Kubičková B, Vašková L, Bláhová B, Wimmerová M, Stiborová M, Hodek P (2015) *Sensors (Basel)* 15:1945
- Hatta H, Kim M, Yamamoto T (1990) *Agric Biol Chem* 54:2531
- Mukoviszidose Institut GmbH (2015) *Clin Trial #NCT01455675*
- Immunsystem AB (2015) *Clin Trial #NCT00633191*
- Ohta M, Hamako J, Yamamoto S, Hatta H, Kim M, Yamamoto T, Oka S, Mizuochi T, Matsuura F (1991) *Glycoconj J* 8:400
- Thomsen K, Christophersen L, Bjarnsholt T, Jensen PØ, Moser C, Høiby N (2015) *Infect Immun* 83:2686
- Hilpert K, Hancock RE (2007) *Nat Protoc* 2:1652
- Montie TC, Doyle-Huntzinger D, Craven RC, Holder IA (1982) *Infect Immun* 38:1296
- Hawdon NA, Aval PS, Barnes RJ, Gravelle SK, Rosengren J, Khan S, Ciofu O, Johansen HK, Høiby N, Ulanova M (2010) *FEMS Immunol Med Microbiol* 59:207
- Mitchell EP, Sabin C, Snajdrová L, Pokorná M, Perret S, Gautier C, Hofr C, Gilboa-Garber N, Koca J, Wimmerová M, Imbert A (2005) *Proteins* 58:735
- Křížková J, Burdová K, Stiborová M, Křen V, Hodek P (2009) *Interdiscip Toxicol* 2:201
- Laemmli UK (1970) *Nature* 227:680

3.4. Přiložená publikace č. 4

Susceptibility of airways to *Pseudomonas aeruginosa* infection: mouse neuraminidase model

Božena Kubičková, Jana Hadrabová, Lucie Vašková, Václav Mandys, Marie Stiborová, Petr Hodek

Monatshefte für Chemie, 148:11, 1993-2002, doi: 10.1007/s00706-017-2035-4 (2017), IF=1,349

Podíl disertantky na prezentované publikaci: Participace na plánování experimentů, práce s buněčnými liniemi a bakteriálními kulturami (fluorescenční značení), provádění adhezních testů, participace na administrativní přípravě projektu pokusů se zvířaty, příprava neuraminidasového myšího modelu - práce s experimentálními zvířaty (intratracheální instilace, monitorování rozvoje infekce pomocí zobrazovacího systému IVIS Lumina XR), vyhodnocení experimentálních dat a jejich statistické zpracování, participace na interpretaci výsledků a přípravě publikace.

K rozšíření znalostí o profylaktickém vlivu protilátek proti PA na úrovni *in vivo* (experimentálních zvířat) bylo nezbytné vyvinout zvířecí model, který by napodoboval podmínky lidské plicní tkáně u nemocných s CF. Přestože bylo popsáno několik myších modelů připravených genetickou manipulací, jejich nevýhodou je především velmi mírný projev onemocnění CF v plicích ve srovnání s klinickými příznaky u lidí. Spontánní či chronické infekce PA a zánět plic, běžné u lidských pacientů s CF, se u myších modelů dosud nedaří úspěšně vyvolat, výjimkou je pouze případ, kdy byly myši vystavené bakteriím asociovaným s agarovými kuličkami (Kukavica-Ibrulj a Levesque 2008). Proto jsme se pokusili vyjít z jiné koncepce a vyvinout nový model *in vivo*, který by věrně napodoboval podmínky dýchacích cest u nemocných CF. Náš model je založen na experimentálních důkazech, že lidský plicní epitel pacientů s CF, na rozdíl od zdravých jedinců, obsahuje méně sialylované glykokonjugáty, zejména asialogangliosid (asialoGM1 a GM2), s terminálními sacharidy D-galaktosou a L-fukosou (Imundo a kol. 1995; Dosanjh a Muchmore 2009). Tyto sacharidové struktury jsou prostřednictvím lektinů PAII a PAIII rozpoznávány bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa* a mohou být příčinou vyšší náchylnosti pacientů s CF k infekcím vyvolaným právě tímto patogenem. Experimentálně lze desialylaci epitelu vyvolat ošetřením buněčného povrchu specifickou glykosidasou, neuraminidasou, která odštěpuje kyselinu sialovou z glykanových struktur, a tak odhalí sacharidové zbytky pro vazbu PA. Ve studii Wolska a kol. (2006) bylo prokázáno, že expozice lidských buňkách epitelu neuraminidase (*C. perfringens*) vedla ke zvýšení adheze PA. Neuraminidasa byla také úspěšně využita pro desialylaci bronchů, bronchiolů a plicního parenchymu myší. Naše studie nejprve vycházela z experimentů *in vitro* prováděné na plicních buněčných liniích CuFi a NuLi a následně po ověření předpokladů byly provedeny pokusy *in vivo* zaměřené na desialylaci epitelu dýchacího traktu myší.

Pro sledování účinku neuraminidasy na adhezi luminiscenčního kmene PA na lidské plicní buněčné linie CuFi (pacient s CF) a NuLi (zdravý jedinec) byly tyto buňky vystaveny zvyšující se dávce neuraminidasy a následně inkubovány s bakteriální suspenzí PA-Lux. S využitím adhezního testu byla kvantifikována asociace bakterií s epiteliálními buňkami jako poměr luminiscence PA-Lux ku relativní fluorescenci epiteliálních buněk. Získané výsledky ukazují, že expozice buněčných linií vyšší koncentraci enzymu (5 U na jamku testovací destičky) vedla k významnému zvýšení adheze PA-Lux k oběma testovaným buněčným liniím. Při porovnání CuFi a NuLi buněk byly buněčné linie od pacienta s CF mnohem citlivější na expozici neuraminidase než NuLi buňky, přičemž

tento rozdíl mezi oběma liniemi byl ještě výraznější při vyšší koncentraci enzymu. Příčinou tohoto výsledku mohou být rozdíly v původní sialylaci obou buněčných linií. Zatímco NuLi buňky jsou hojně sialylovány, k dosažení rozsáhlé desialylace je pravděpodobně třeba větší množství enzymu než v případě CuFi buněk, u nichž je terminální kyselina sialová vázána v menší míře a použité množství neuraminidasy postačovalo k desialylaci zbytkových glykokonjugátů (Dosanjh a Muchmore 2009; de Bentzmann a kol. 1996). Jak již bylo zmíněno, desialylací buněčného povrchu vznikají asialované glykokonjugáty, které působí jako receptory pro virulenční faktory PA, což vede ke zvýšení adheze patogenu. Navíc, na desialylaci se může podílet také bakteriální neuraminidasa, kterou některé mikroorganismy, včetně PA, vylučují do svého okolí a využívají jako virulenční faktor zvyšující jejich patogenitu (Soong a kol. 2006). Ze získaných dat z pokusů s buněčnými liniemi lze vyvodit, že neuraminidasa zvyšuje citlivost obou buněčných linií k adhezi PA, avšak u NuLi buněk je třeba pro rozsáhlou desialylaci povrchu aplikovat dostatečné množství tohoto enzymu.

V dalším kroku jsme se zaměřili na experimenty *in vivo*, sledování vlivu neuraminidasy na plicní tkáň myši a s tím spojenou náchylnost k infekcím PA. Nejprve jsme ověřili, že neuraminidasa sama o sobě nezpůsobuje zánětlivé změny či poškození plicního parenchymu. Ani po 36hodinovém působení maximální dávky enzymu (100 U) aplikované intratracheální instilací do plic myši, nebyly při mikroskopickém hodnocení řezů tkáně patrné histopatologické změny. Zároveň imunohistologická analýza plicní tkáně pomocí protilátky proti kyselině sialové odhalila výrazný pokles sialylace alveolárního povrchu plic vystaveného 100 U neuraminidasy ve srovnání s kontrolní tkání (aplikace PBS) a potvrdila tak schopnost enzymu desialyzovat povrch plicního parenchymu *in vivo*.

V rámci dalšího experimentu byla modelovým zvířatům nejprve intratracheální instilací aplikována neuraminidasa (dávka 10 a 100 U) a o 14 hodin později optimalizovaná dávka bakteriální suspenze PA-Lux (5×10^5 CFU). Zdravotní stav myši byl sledován následující dva dny. Po ukončení experimentu byl každému zvířeti odebrán ze čtyř segmentů plicní tkáně vzorek, který byl podroben histologické analýze provedené patologem. Abychom mohli kvantifikovat míru poškození plicního parenchymu byly zánětlivé změny klasifikovány do čtyř diagnostických kategorií: N (normální) a tři stupně závažnosti katarální bronchopneumonie A, B a C. Kategorie N odpovídá fyziologickému stavu plicní tkáně bez zánětlivých změn, s normální strukturou průdušek a alveol. Kategorie A popisuje disperzní bronchopneumonii s jednotlivými menšími zánětlivými

ložisky a hnisavým exsudátem s vysokým obsahem neutrofilů v brochiolech a alveolech. Kategorie B je charakterizována splývající bronchopneumonií s plošně rozsáhlými a silně hnisavými zánětlivými ložisky a kategorie C představuje nekrotizující bronchopneumonii s většími oblastmi rozpadající se plicní tkáň. Četnost těchto diagnostických kategorií nalezená v každé skupině zvířat exponované rozdílné dávce neuraminidasy a následně infikované PA-Lux je vynesena do grafu na obr. 8 (viz publikace č. 4, str. 98). Z tohoto grafu je zřejmé, že aplikace neuraminidasy před expozicí experimentálních zvířat PA-Lux významně zvyšuje zánětlivou odpověď a poškození plicní tkáň způsobené bakteriální infekcí. Navíc je zde dobře patrný trend, kdy s rostoucí dávkou enzymu se zvyšuje i míra poškození plicního parenchymu. Nejtěžší poškození (kategorie C), nekrotizující pneumonie, byla nejčastěji pozorována ve skupině myší ošetřených nejvyšší dávkou neuraminidasy (100 U). Jelikož v předchozím experimentu bylo potvrzeno, že podání neuraminidasy samo o sobě nezpůsobuje žádné patologické změny ani známky zánětu plicního parenchymu, je zvýšená citlivost respiračního traktu myší k infekci PA dána desialylací glykokonjugátů na povrchu epitelálních buněk působením neuraminidasy.

V rámci provedených experimentů se podařilo vyvinout myší model, který napodobuje podmínky v dýchacím traktu nemocných CF s ohledem na zvýšenou citlivost k infekci *Pseudomonas aeruginosa* v důsledku snížené míry sialylace epitelu. Tento model bude využit v dalších experimentech pro testování ochranného vlivu anti-PAIII IgY proti infekci PA.



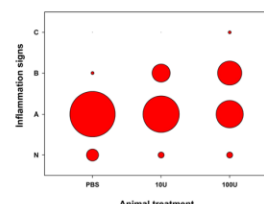
Susceptibility of airways to *Pseudomonas aeruginosa* infection: mouse neuraminidase model

Božena Kubíčková¹ · Jana Hadrabová¹ · Lucie Vašková¹ ·
Václav Mandys² · Marie Stiborová¹ · Petr Hodek¹

Received: 31 March 2017 / Accepted: 10 July 2017 / Published online: 14 September 2017
© Springer-Verlag GmbH Austria 2017

Abstract The adhesion of a pathogen, e.g., *Pseudomonas aeruginosa* (PA), to airway epithelial cells is the initial step in bacterial lung infection. The lung epithelial cells of cystic fibrosis (CF) patients frequently contain glycoconjugates with low sialylation, which increases their susceptibility to bacteria adherence. The enzyme neuraminidase can induce similar conditions by the cleavage of sialic acid from glycoconjugates. Resulting asialogangliosides may act as receptors for pathogens. This study aimed to develop a neuraminidase-induced model mimicking conditions of CF patient lungs. The impact of neuraminidase was studied in two experimental systems: (i) male mice and (ii) human cell lines from normal and CF lungs. Neuraminidase (1, 10, or 100 U per lung) was applied by intratracheal instillation to model animals. Fourteen hours later, the animals were intratracheally infected with a PA dose (5×10^5 CFU). The health status of animals was monitored for two consecutive days. The lung tissue was examined histologically by means of standard staining methods. Sialylation of the lung tissue was detected immunohistologically using an anti-sialic acid antibody. The effect of neuraminidase on PA adherence was also examined in vitro in airway cell lines. Our findings indicate that neuraminidase stimulates PA adherence on cells and can potentiate PA-initiated inflammatory response and exacerbate lung injury.

Graphical abstract



Keywords Cystic fibrosis · Neuraminidase · *Pseudomonas aeruginosa* · Epithelium sialosides (sialylated molecules) · Bacterial adherence

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disorder resulting from mutations of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene located on human chromosome 7. The gene mutations result either in malfunction or absence of CFTR protein, leading to multi-organ dysfunction. The CF manifestations are rather diverse. They include meconium ileus and peritonitis, failure to thrive, nasal polyposis, pancreatitis, malabsorption, cirrhosis, and recurrent and mainly persistent pulmonary infections with bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* complex, and *Pseudomonas aeruginosa* (PA). CFTR is involved in chloride ion transport across the apical membrane of epithelial cells and regulation of other ion channels (e.g., ENaC, epithelial sodium channels). Normal epithelial airway cells use the CFTR as a receptor for internalization of opportunistic microorganisms, especially for *P. aeruginosa* via endocytosis

✉ Petr Hodek
hodek@natur.cuni.cz

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8, 128 40 Prague 2, Czech Republic

² Department of Pathology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Ruská 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic

[1, 2]. The defect in the CFTR protein results in changed ionic composition of the airway surface liquid and increased the viscosity of the mucus, thereby adversely affecting the function of mucociliary clearance. Local defense mechanisms are further undermined by a lower pH of the microenvironment, which reduces the efficiency of granulocyte defensins, lysozyme, and lactoferrin [3]. As a consequence of these manifestations, there are frequent bacterial infections that lead to the development of a chronic inflammation followed by the progressive destruction of lung tissue, which is the most common cause of patient death [4].

Pseudomonas aeruginosa contains a variety of virulence factors. The primary adhesion of bacteria to the airway epithelium is mediated by virulence factors which are associated with a bacterial cell (lipopolysaccharide, lectins, fimbria, flagella). The second group of virulence factors is represented by *P. aeruginosa*-secreted extracellular products such as enzymes (elastase, phospholipase C, exotoxin A), pigments (pyocyanin, hemagglutinin), or toxins [5]. One of the significant virulence factors is *Pseudomonas*-expressed flagellin which serves as a ligand for mucin MUC1 ectodomain of eukaryotic cells. Interestingly, the binding affinity of flagellin for MUC1 is regulated by eukaryotic sialidase NEU1. The NEU1-driven MUC1 desialylation rapidly increases PA adhesion to and invasion of the airway epithelium. On the other hand, the MUC1 desialylation also increases its shedding and the shed MUC1 competitively blocks *P. aeruginosa* adhesion to cell-associated MUC1 [6]. According to Lillehoj et al. [6], *P. aeruginosa*, in a ligand-specific manner, mobilizes eukaryotic NEU1 to enhance bacterial pathogenicity, but the host retaliates by releasing MUC1 into the airway lumen as a hyperadhesive decoy receptor.

As the mutations of CFTR give rise to a broad spectrum of manifestations, it is difficult to develop an animal model accurately mimicking the human disease signs [7, 8]. Recently, several murine CF models have been described. Mice compared to other animals are advantageous as they can be easily genetically manipulated to form transgenic or knockout animals, or backcrossed to well define inbred strains within a short period of time. The majority of symptoms in CF mice, depending on the particular model, are quite similar to those in CF patients. On the contrary, the disadvantage of CF murine models is only a slight manifestation of the disease in their lungs. Because of that the CF mice do not easily develop “spontaneous” chronic bacterial infections of lung and/or inflammation common in human CF patients [9]. To induce long-lasting infections, the mouse should be challenged with bacteria attached to agar beads [8]. The reasons for this discrepancy are not clear. In part it might be related to the relative paucity of submucosal glands in the murine trachea and major bronchi compared with the human large airways, and

in part to the expression of alternate (non-CFTR) chloride channels in murine airway epithelia [10].

Since the airway changes typical for CF patients (e.g., enhanced susceptibility to bacterial infections) have not been successfully met by any available animal model we tried to develop a new in vivo model that would particularly mimic CF lung conditions. Our concept is based on the experimental evidence that CF human lung epithelium contains (on the contrary to healthy tissue) more frequently low-sialylated glycoconjugates, especially, asialoganglioside (asialoGM1, GM2) exposing accessible D-galactose and L-fucose residues [11–13]. Such conditions possibly underlie the higher susceptibility of CF patients to PA infections, since the bacterium binds to these sugar moieties via its PAIL and PAIIL lectins, major PA virulence factors [4, 14]. In our previous studies, the yolk antibody prepared against PAIIL lectin significantly reduced the PA adherence to human CF lung epithelium cells [15, 16] and was well tolerated when administered via inhalation to rats [17]. To extend this promising research of PA prophylactic antibodies the relevant in vivo CF animal model mimicking the conditions of human CF pulmonary tissue is urgently needed.

The situation of impaired sialylation can be induced experimentally by the cell treatment with a specific glycosidase, neuraminidase, which can cleave sialic acid from epithelium sialosides and thus change a broad range of cellular functions, including the cellular response to the bacterial stimulation [18, 19]. For instance, exposed subterminal saccharide residues can serve as targets for bacterial lectins. It has already been proven that the ex vivo incubation of buccal epithelial cells with neuraminidase (*C. perfringens*) resulted in the increased PA adherence. Asialogangliosides of human buccal epithelial cells were suggested to function as receptors for several bacterial strains [20]. The application of neuraminidase was also tested in vivo to desialylate the bronchi, bronchioles, and alveolar compartments of mice lungs. In that study authors found that the mouse lung tissue glycoconjugates were sialylated mainly via α -2,6- and to a lesser extent via α -2,3-linkage [21, 22].

To the best of our knowledge, there are no literature data dealing with in vivo PA infection of mice having experimentally desialylated lung epithelium. Present data report the development of a mouse CF lung model by neuraminidase treatment of airways and the examination of their susceptibility to PA infection.

Results and discussion

The recent CF models are virtually limited to mice bearing CF defect caused by various CFTR gene mutations. Regardless of the CF mouse model, the murine airways are

not affected enough to mimic the conditions of human CF pulmonary tissue especially with regard to their susceptibility to PA infections. Since the airway surfaces of CF patients are frequently lacking the sialylation of glycoconjugates it seems plausible to develop such conditions in experimental animals by the application of neuraminidase, the enzyme which is able to cleave sialic acid from sialosides. Such experiments were carried out in vitro with CF lung epithelial cell line and in vivo with mice.

Optimization of the PA dose

To investigate neuraminidase-induced susceptibility of airway epithelium towards PA infection we used a transgenic PA strain, PA-Lux, emitting luminescence. Thus, it is possible to monitor the infection progression in the course of the whole experiment. Our previous study conducted with rats indicated the necessity of using mice since the luminescence from PA-Lux-infected rat lungs was not able to reach the charge-coupled device (CCD) sensor of IVIS imaging system (data not shown). First, it was essential to find an appropriate dose of PA-Lux causing not an early mouse death but the infectious process which lasts for several days. Using an intratracheal instillation of PA-Lux, infection doses 10^5 – 10^7 colony-forming unit (CFU) were tested. As shown in Fig. 1, 3 h after the PA-Lux application the luminescent signal was clearly visible for bacterial loads 10^7 and 10^6 , but not 10^5 CFU. However, the dose of 10^7 CFU was lethal for the animals. When comparing the luminescence at 3 and 24 h from the mice challenge with PA-Lux (see Fig. 2) it is clear that animals treated with 10^6 CFU developed a severe lung infection. After this pilot experiment a slightly reduced dose of 5×10^5 CFU of PA-Lux was tested on a larger number of animals (11 mice). Figure 3 (panel A) depicts the luminescence scans of individual animals 48 h after the PA challenge. About 2/3 of animals were able to recover from the PA infection. More precise data (photons per cm^2) plotted in Fig. 3 (panel B) confirm the visual evaluation. Thus, herein reported dose 5×10^5 CFU of PA-Lux was found optimal and further used in infection experiments, in which the PA susceptibility of mice airways will be affected by neuraminidase treatment.

Effect of neuraminidase on adherence PA-Lux to human epithelial cell lines

Prior to the experiments with animals the effect of neuraminidase on PA adherence was examined in vitro with human airway epithelium cells. CuFi or NuLi cells (immortalized epithelium cell lines derived from normal (NuLi) or CF (CuFi) human lungs) were exposed to increasing dose of neuraminidase (from *C. perfringens*)

and then incubated with bacteria PA-Lux. The adherence of bacteria was quantified based on their luminescence and related to epithelium cell fluorescence. Such experimental design allows eliminating possible differences caused by unequal number of epithelial cells in the wells. The results shown in Fig. 4 demonstrate that neuraminidase treatment, namely with the high enzyme concentration (5 U per well), caused a significant increase in bacterial adherence to both cell lines. Comparing data for CuFi and NuLi cell lines, CuFi cells were unexpectedly much more sensitive to the neuraminidase treatment; with increasing enzyme concentrations, the distinction between CuFi and NuLi was even more pronounced. This observation can be attributed to differences in the original sialylation of CuFi and NuLi cells. The amount of the neuraminidase applied to the NuLi monolayer was probably not enough to achieve an extensive desialylation of abundantly sialylated cell surfaces. In case of CuFi cells, which are suggested to be deficient in sialylation [12, 23], the amount of neuraminidase already sufficed to desialylate their residual glycoconjugates. Such conditions resulted in enhanced bacterial adherence. In line with the literature data, the desialylation of cell surface produces asialogangliosides, which act as receptors for PA adhesion (for example, bacterial pilin) [24, 25]. In particular, Imundo et al. [11] have identified asialoganglioside GM1 as a receptor for PA adherence on CF bronchial cells. Moreover, some pathogens, including PA, secrete neuraminidases in their environment to facilitate tissue invasion [26]. Besides other bacterial enzymes, extracellular neuraminidases are virulence factors that may potentiate the bacterium pathogenicity.

Taking together the obtained data, the neuraminidase treatment can increase the cell susceptibility towards the PA infection; however, higher concentrations of the enzyme are needed for normal than for CF cells.

Impact of neuraminidase treatment on mice lungs and bacterial infection

The following study was focused on the neuraminidase effect on mice lungs in vivo and on the subsequent susceptibility to PA infection. First, the lung tissue samples from mice treated with an increasing dose of neuraminidase were examined histologically to evaluate inflammatory changes and tissue damage. Micrographs in Fig. 5 show that when even the highest enzyme dose (100 U of neuraminidase) was used, no pathologic changes of the lung parenchyma have been found. The small bronchi, bronchioles and lung alveoli were structurally normal, the mucosal epithelia were intact, and no apparent inflammation was present. Immunohistological analysis of the lung tissue using anti-sialic acid antibody revealed marked decrease in the sialylation of alveolar surfaces

Fig. 1 Visualization of bacterial loads in mouse lungs. Luminescence intensity of PA-Lux (photon $\times s^{-1} \times cm^{-2}$) was measured 3 h after intratracheal instillation of 10^5 (a), 10^6 (b), and 10^7 (c) CFU in $30 mm^3$ PBS into lungs of mice

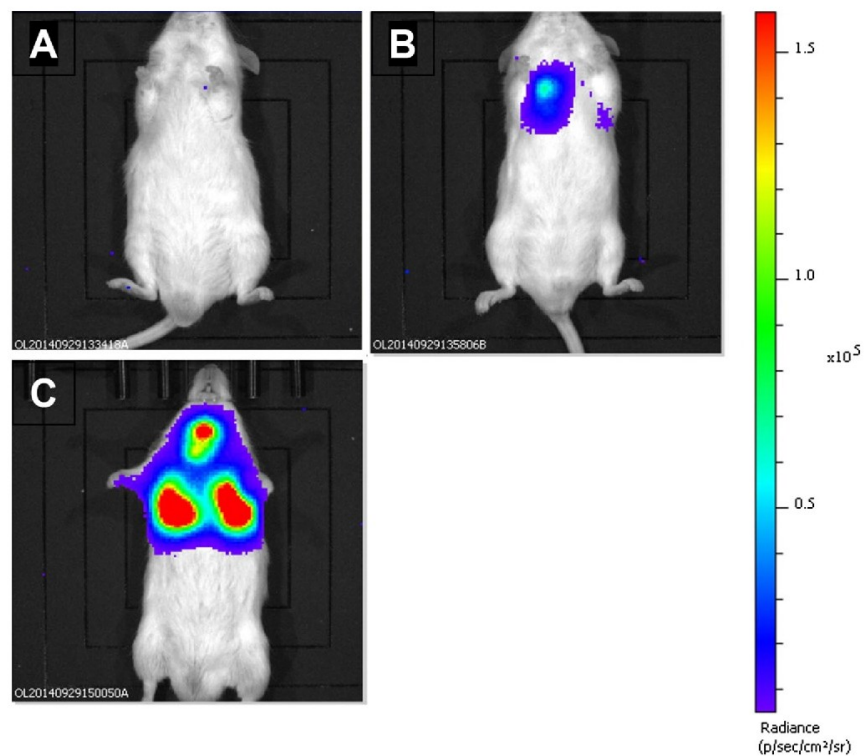
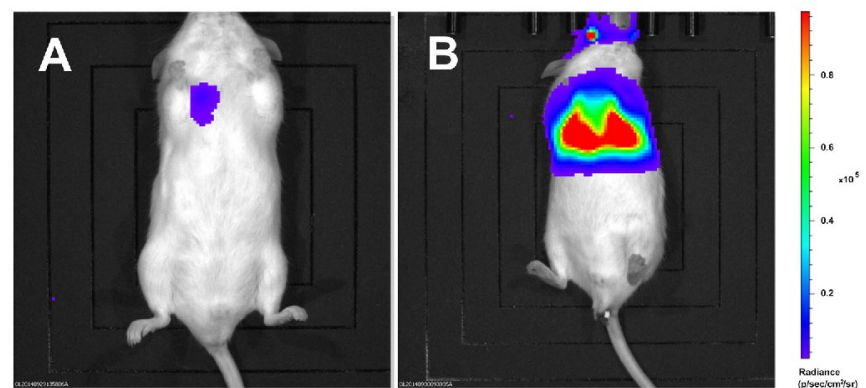


Fig. 2 Development of bacterial infection. The progress of infection in a representative mouse was monitored 3 h (a) and 24 h (b) after the administration of 10^6 CFU PA-Lux. For comparison, the luminescence scans were captured at the same apparatus setup (2 min on IVIS imaging system Lumia XR)



exposed to 100 U of neuraminidase when compared to PBS-treated control (see Fig. 6).

In the next experiment, animals were treated with neuraminidase (10–100 U) and 14 h later infected with PA-Lux. Their health status was monitored for two consecutive days. After the experiment termination, the lung tissue of each animal was processed by routine histological technique and the slides were examined by an experienced pathologist (V.M.). Inflammatory changes were classified

into four diagnostic categories: N (normal), and A, B and C as extension and severity of the tissue damage (see Fig. 7). Category N represents the physiological status of the lung tissue without inflammatory changes, with normal structure of the bronchi and alveoli. Category A describes a dispersed bronchopneumonia with patchy suppurative, neutrophil-rich exudate within the bronchioles and alveoli. Category B is characterized with a confluent bronchopneumonia, larger areas of the lung parenchyma showing

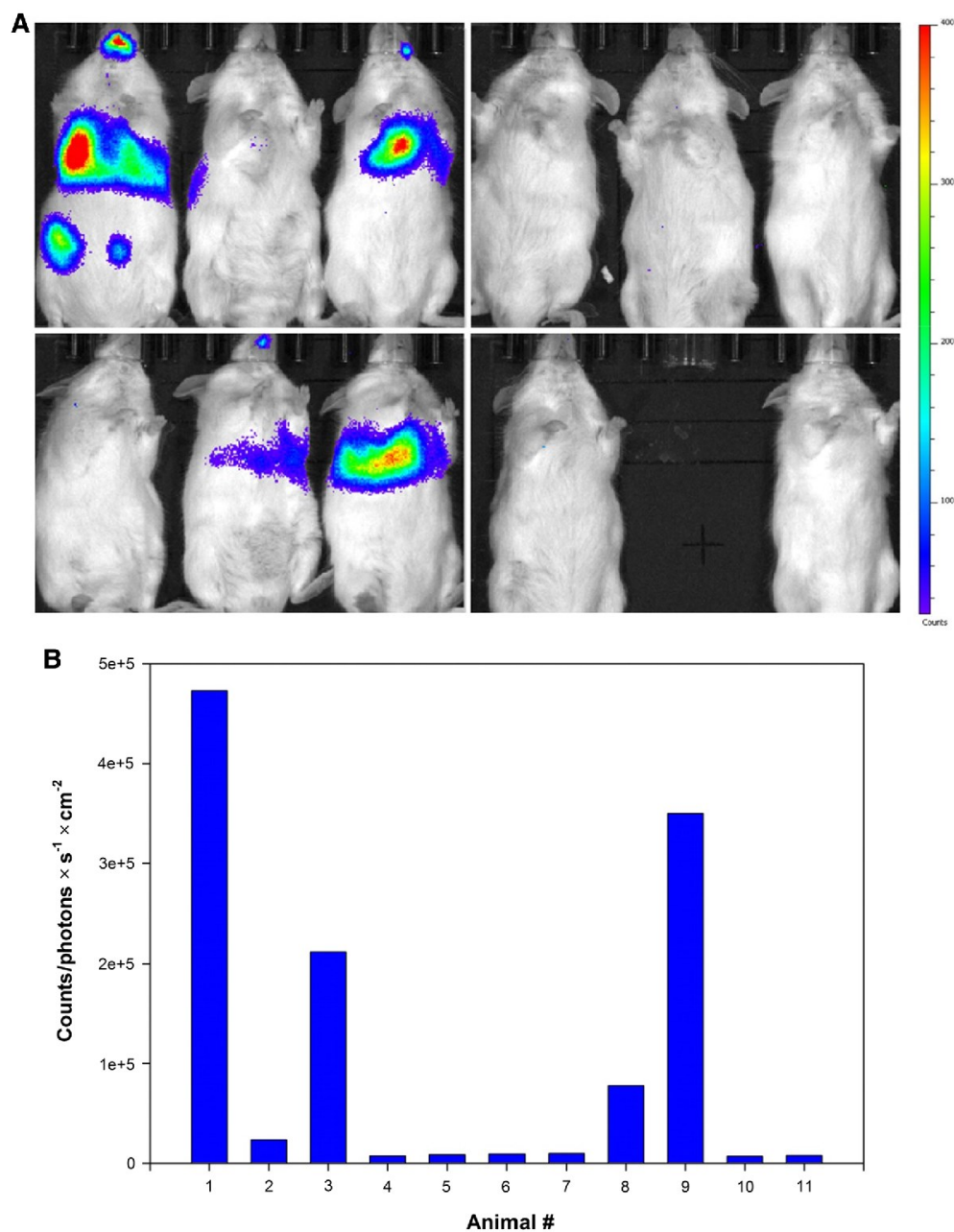


Fig. 3 Comparison of infected mice. Animals were challenged with 5×10^5 CFU PA-Lux in 30 mm³ PBS. 24 h after PA infection the luminescence intensity of lungs was visualized (a) as well as determined in counts (b)

severe suppurative inflammation. Category C represents a necrotizing pneumonia characterized by larger areas of the lung tissue decay.

The frequencies of these diagnostic categories found in each group of PA-infected animals pre-treated with

increasing concentrations of neuraminidase (0, 10, and 100 U) are summarized and plotted (see Fig. 8). The graph shows that the exposure of animals to neuraminidase is worsening of the PA infection process. Moreover, the lung tissue deterioration is apparently dependent on the

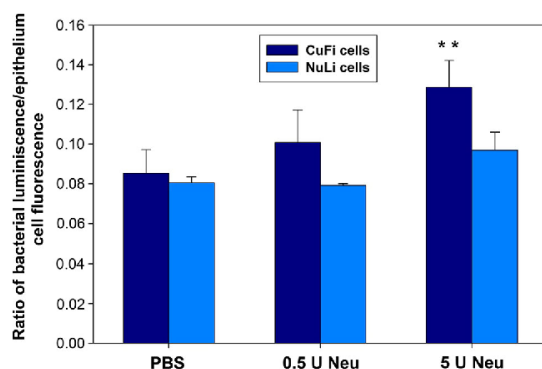


Fig. 4 Adherence of PA-Lux on neuraminidase-treated epithelial cells. Neuraminidase (Neu) at 0.5 and 5.0 U per well was incubated for 1 h with epithelial cells prior to PA-Lux exposition. Adhered PA-Lux and epithelial cells (CuFi or NuLi) were quantified as their luminescence and fluorescence, respectively. Results are expressed as a ratio of PA luminescence/epithelium cell fluorescence. Plotted data are mean \pm SD of three independent determinations

neuraminidase concentration. The necrotizing pneumonia (category C) occurred most frequently in the group of mice pre-treated with 100 U of neuraminidase. The present data provide evidence that the application of neuraminidase prior to the challenge mice lungs with PA significantly increases the inflammatory response and tissue decay caused by bacterial infection.

Bacterial enzymes including neuraminidase, which removes sialic acid from glycoconjugates, are important virulence factors of pathogens targeting mucosal surfaces [27]. For instance, *Streptococcus pneumoniae* or *P. aeruginosa* use mostly neuraminidases during colonization of mammalian hosts [26]. Thus, our findings show, in accordance with literature data, that the pre-treatment of

airways with neuraminidase significantly increases the sensitivity of host respiratory epithelium cells to develop bacterial infections, inflammatory response, and acute lung injury.

Conclusion

Our findings indicate that neuraminidase instilled into murine airways noticeably increases the mice susceptibility to develop PA-induced inflammation. As the neuraminidase administration by itself did not cause any pathological changes or inflammation signs in inspected slices of mouse lungs, the enhanced mouse sensitivity to PA infection arises from desialylation of glycoconjugates on the surface of airway epithelial cells. The dose of 100 U neuraminidase significantly increases the bacterial inflammation caused by 5×10^5 CFU of PA-Lux. In summary, we developed a mouse model mimicking conditions of human CF lungs in respect of their elevated susceptibility towards PA infection. Such mice model will be used in our further experiments when the protective effect of anti-PAIIL antibody against PA infection will be tested.

Experimental

PKH67 dye for epithelium cell staining was from Sigma Chemical Co. (USA). Immortalized epithelium cell lines derived from normal (NuLi) or CF (CuFi) human lungs were purchased from ATCC (Poland). LHC-9 medium was from Gibco™ Invitrogen (UK). PS medium (peptone/casein digest) for bacterial cultivation was prepared at the Institute of Microbiology of the CAS (Czech Republic). Luminescent strains of *P. aeruginosa*, PA-Lux [Sequence

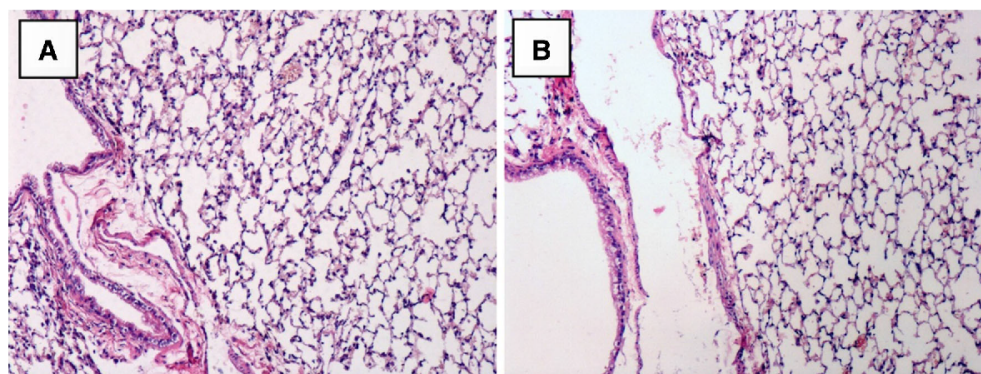


Fig. 5 Microscopic picture of the lung tissue exposed for 36 h to different neuraminidase doses. Normal appearance of the lung tissue without pathological changes: a 0 U (control), b 100 U. Original magnification $\times 100$ (Nikon Eclipse 80i)

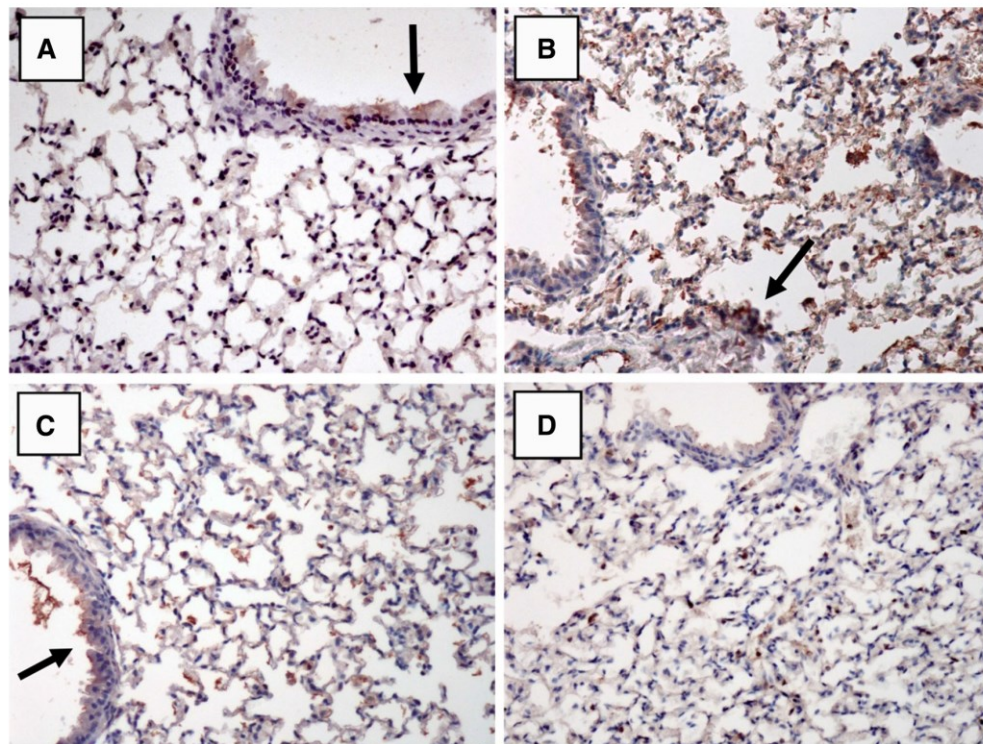


Fig. 6 Representative images of immunohistochemical analyses of the lung tissue treated with neuraminidase. Visualization of sialic acid by anti-sialic acid antibody. Arrows point the stained areas.

Micrographs show lung tissues exposed to different neuraminidase doses: **a** 0 U (control), **b** 1 U, **c** 10 U, and **d** 100 U. Original magnification $\times 200$ (Nikon Eclipse 80i)

Type (ST) 549], were a generous gift of Dr. Robert E. W. Hancock, University of British Columbia, Vancouver (Canada). Neuraminidase from *C. perfringens* was purchased from New England BioLabs (UK) and rabbit polyclonal antibody against sialic acid for immunohistological analysis was from Baria s.r.o. (Czech Republic). All other chemicals were of reagent grade and were purchased from Sigma-Aldrich, DAKO or Lachema (Czech Republic).

Animals used in experiments

Male mice (outbred strain ICR CD1) of 10–12 weeks of age (weigh about 35 g) were obtained from AnLab s.r.o. (Czech Republic). All mice were housed separately and had access to food and water ad libitum (The National Institute of Public Health in Prague, Czech Republic). The animal study was conducted in accordance with the Regulations for the Care and Use of Laboratory Animals (311/1997, Ministry of Agriculture, Czech Republic) under an approved experimental protocol 29/2015 and efforts were made to minimize the number of animals and any

discomfort to them. For intratracheal instillation, mice were anesthetized by a subcutaneous application of ketamine/xylazine mixture (1.25/0.5 mg in 50 mm³ per 35 g body weight). The depth of anesthesia was tested by swallowing and foot reflexes. The duration of anesthesia (usually 30 min) suffices for the intratracheal application of PA-Lux or neuraminidase doses. For the monitoring of PA infection by IVIS imaging system, mice inhaled 2% isoflurane before and during the measurement.

Epithelial cell staining

Airway cells were stained with fluorescent dye PKH67 according to the general manufacturer's protocol. In brief, monolayers of NuLi or CuFi cells attached to bottom of 24-well plate were washed with PBS (150 mm³ per well), diluent C (75 mm³ per well) and then incubated (5 min) with an equivalent volume of 4 μ M PKH67 (in diluent C). Then, the staining was terminated with the addition of FBS (twofold volume excess of 100% and then 1% FBS) and cells were washed repeatedly with LHC-9 medium to remove an excess of the dye.

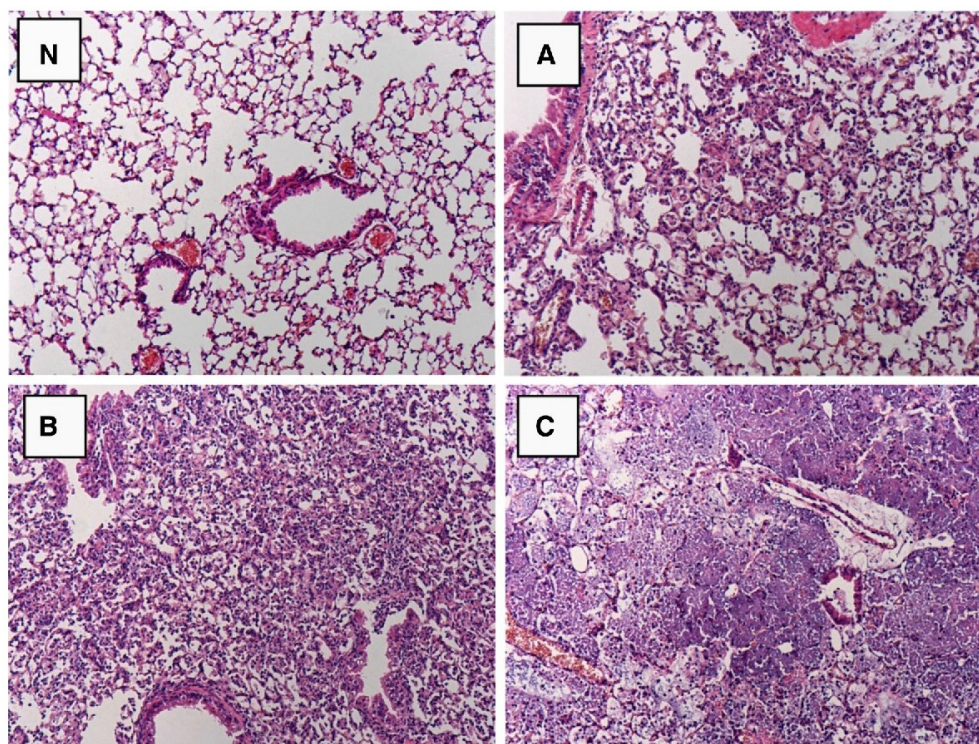


Fig. 7 Representative histological images of PA-Lux-infected lung tissues pre-treated with neuraminidase. The mice exposed to neuraminidase (10 or 100 U) or PBS as a control were infected 14 h later with 5×10^5 CFU of PA-Lux. Four morphologic

categories are presented in micrographs: **N** (normal tissue), **A** (dispersed bronchopneumonia), **B** (confluent bronchopneumonia), and **C** (necrotizing pneumonia). Original magnification $\times 100$ (Nikon Eclipse 80i)

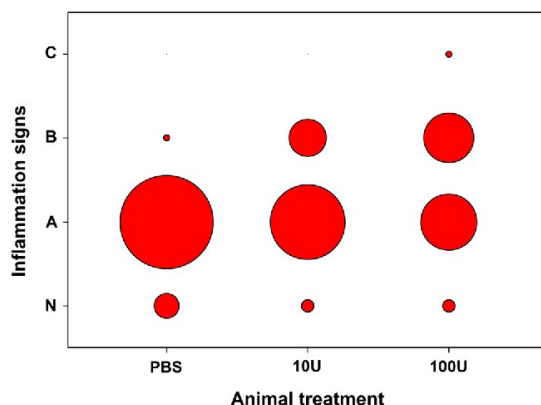


Fig. 8 The frequency of diagnostic categories of PA infection model. The mice pre-treated with neuraminidase (10 or 100 U) or PBS as a control were infected 14 h later with 5×10^5 CFU of PA-Lux. After 36 h from mice infection their lungs were fixed, paraffin embedded, and processed for histological analysis. Four diagnostic categories according to severity were visually assigned: **N** (normal physiological state), **A** (dispersion bronchopneumonia), **B** (confluent bronchopneumonia), and **C** (necrotizing bronchopneumonia)

Bacterial adhesion on neuraminidase-treated epithelial cells

The assay was performed according to Noskova et al. [16] with minor modifications. Immortalized human epithelium cell lines NuLi or CuFi were seeded (5.5×10^5 cells per well) onto 24-well plates Cell BIND (Corning, USA) and incubated for 48 h at 37 °C and 5% CO₂ to form a confluent layer and stained with fluorescent dye PKH67. Then sialic acid from cells CuFi/NuLi was cleaved by neuraminidase NanH (42.8 kDa) from *C. perfringens* or treated with PBS as a control. The cells in wells were incubated with the neuraminidase (0, 0.5, or 5 U in the PBS pH 6.5) for 60 min at 37 °C while gently shaking and then washed once with PBS. PA-Lux bacterial suspension (5.5×10^7 CFU per well) was added to cell monolayers and incubated for 2 h at room temperature in dark. Non-adhered bacteria were removed by extensive washing with PBS. To quantify adhered PA on epithelial cells, the PA luminescence and fluorescence of NuLi/CuFi cells (Ex 470 nm, Em 505 nm) were determined using spectrofluorometer (Tecan Infinite M200 Pro). Results were expressed

as a relative ratio the PA luminescence/epithelium cell fluorescence.

Airway PA infection in untreated mice

Bioluminescent *P. aeruginosa* (PA-Lux) was grown at 37 °C in suspension culture in PS medium (peptone/casein digest) overnight, pelleted by centrifugation, washed twice with sodium phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, and resuspended in PBS to the working concentration. Mice (11 animals) in anesthesia were infected with PA-Lux (5×10^5 CFU in 30 mm³ PBS) by intratracheal instillation. Thereafter the health status of mice was monitored for 45 h. The use of PA-Lux, a luminescent PA strain, allowed a non-invasive monitoring of the PA infection development using IVIS imaging system Lumia XR (Caliper Life Sciences, USA). PA infection loads in lungs were quantified based on the luminescence intensity per area of lungs (photon \times s⁻¹ \times cm⁻²).

PA infection of mice pre-treated with neuraminidase

Neuraminidase (0, 1, 10, 100 U in 30 mm³ PBS) was applied by intratracheal instillation to anesthetized model animals (4 groups per 6 animals). Fourteen hours later, five animals of each group were infected in the same manner with an optimized dose (5×10^5 CFU in 30 mm³ PBS) of PA-Lux. The remaining animals were not infected and served as a control. The animal health status was monitored for two consecutive days. After the termination of experiments histological samples were prepared from four segments of lung tissue of each mouse and either stained with cellular dye or probed with anti-sialic acid rabbit IgG to visualize the sialylation of the airway cells (see below).

Lung histopathology and immunohistology examination

After mouse euthanasia, its thoracic cavity was opened to expose the trachea. Then polypropylene feeding tube with ball-tip was inserted into the trachea incision. Solution (10% buffered formalin, 0.5 cm³) was slowly instilled to perform the gentle fixation of the lung tissue. During the fixation, all lungs were equally expanded using constant pressure. Below the ball-tip the trachea was ligated with a string, the lungs were dissected and transferred into 10% buffered formalin. Tissue blocks from upper and lower lobes of each lung were processed by a routine paraffin technique. Five-micron-thick tissue slices were stained with hematoxylin and eosin and examined under light microscope (Nikon Eclipse 80i). The histological changes in the lungs were scored. For each animal, representative areas of lung parenchyma were analyzed.

Immunohistological detection of SA was performed in deparaffinized 5- μ m-thick lung tissue sections. After pre-treatment with Dako Target Retrieval Solution (30 min, pH 9), the slides were incubated with primary polyclonal antibody to sialic acid and consequently with Dako REAL EnVision HRP. DAB+ was used as a chromogen.

Acknowledgements This work has been supported by the Grant Agency of the Charles University (GAUK) 1584814 and University Research Center (UNCE) 204025/2012.

References

- Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC (1995) Science 269:847
- Pier GB (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:8822
- Davis PB, Drumm M, Konstan MW (1996) Am J Respir Crit Care Med 154:1229
- Campodónico VL, Gadjeva M, Paradis-Bleau C, Uluer A, Pier GB (2008) Trends Mol Med 14:120
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (2015) Medical microbiology. Elsevier, Philadelphia
- Lillehoj EP, Hyun SW, Liu AG, Guang W, Verceles AC, Luzina IG, Atamas SP, Kim KC, Goldblum SE (2015) J Biol Chem 290:18316
- Schulte BJ, Davidson DJ, Wilke M, De Jonge HR (2004) J Cyst Fibros 3:183
- Kukavica-Ibrulj I, Levesque RC (2008) Lab Anim 42:389
- Lavelle GM, White MM, Browne N, McElvaney NG, Reeves EP (2016) Biomed Res Int 2016:5258727
- Guilbault C, Saeed Z, Downey GP, Radzioch D (2007) Am J Respir Cell Mol Biol 36:1
- Imundo I, Barasch J, Prince A, Al-Awqati Q (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:3019
- Dosanjh A, Muchmore EA (2009) Open Respir Med J 3:79
- Kirkeby S, Wimmerová M, Moe D, Hansen AK (2007) Microbes Infect 9:566
- Bryan R, Kube D, Perez A, Davis P, Prince A (1998) Am J Respir Cell Mol Biol 19:269
- Vašková L, Nosková L, Bláhová B, Wimmerová M, Dřevínek P, Kubičková B, Stiborová M, Hodek P (2016) Monatsh Chem 147:889
- Nosková L, Kubičková B, Vašková L, Bláhová B, Wimmerová M, Stiborová M, Hodek P (2015) Sensors (Basel) 15:1945
- Hadravová J, Majerová B, Černá V, Moserová M, Holuša R, Mandys V, Stiborová M, Stříž I, Hodek P (2015) J Appl Biomed 13:19
- Stamatos NM, Curreli S, Zella D, Cross AS (2004) J Leukoc Biol 75:307
- Feng C, Zhang L, Nguyen C, Vogel SN, Goldblum SE, Blackwelder WC, Cross AS (2013) J Immunol 191:4828
- Wolska K, Zabielska K, Jakubczak A (2006) Pol J Microbiol 55:43
- Nicholls JM, Bourne AJ, Chen H, Guan Y, Peiris JS (2007) Respir Res 8:73
- Ning ZY, Luo MY, Qi WB, Yu B, Jiao PR, Liao M (2009) Vet Res Commun 33:895
- de Bentzman S, Roger P, Dupuit F, Bajolet-Laudinat O, Fuchey C, Plotkowski MC (1996) Infect Immun 64:1582
- Paranchych W, Irvin RT, Hodges RS, Woods DE (1991) Pediatr Pulmonol Suppl 6:134

2002

B. Kubíčková et al.

25. Cacalano G, Kays M, Saiman L, Prince A (1992) *J Clin Invest* 89:1866
26. Soong G, Muir A, Gomez MI, Waks J, Reddy B, Planet P, Singh PK, Kaneko Y, Wolfgang MC, Hsiao YS, Tong L, Prince A (2006) *J Clin Invest* 116:2297
27. Wagner R, Matrosovich M, Klenk HD (2002) *Rev Med Virol* 12:159

4. Závěr

Disertační práce shrnuje výsledky našeho výzkumu zaměřeného na využití slepičích protilátek IgY jako alternativního terapeutického přístupu k prevenci infekcí způsobených oportunním patogenem *Pseudomonas aeruginosa* u pacientů s cystickou fibrosou. Výhody slepičích žloutkových imunoglobulinů spočívají především v jejich ekonomické produkci a snadné přípravě, což je činí vynikajícím nástrojem pro pasivní imunizaci nemocných s CF.

Prvním úkolem bylo prozkoumat potenciální prozánětlivé vlastnosti protilátek IgY na základě (jimi indukované) produkce cytokinů. Důležitým výsledkem, který koreluje s daty získanými z literatury, je potvrzení, že IgY nevyvolávají významnou produkci prozánětlivých cytokinů u plicních buněčných linií pacienta s CF (CuFi) ani zdravého jedince (NuLi). Koncentrace všech testovaných cytokinů jsou srovnatelné s fyziologickými hodnotami v lidském séru. Imunoglobuliny IgY tedy nejsou pro plicní buňky zánětlivé a mohou být postoupeny dalšímu studiu jejich potenciálního využití pro antibakteriální profylaxi infekcí dýchacích cest.

Pro další výzkum zaměřený na IgY připravené proti virulenčním faktorům PA bylo zásadní vyvinout testovací systém, kterým by bylo možné analyzovat vliv protilátek IgY a případně dalších sloučenin na adhezi PA k plicním epiteliálním buňkám. Úspěšně jsme navrhli a zavedli nový test adherence bakterií PA na plicní epiteliální buňky. Test prováděný *ex vivo* je založen na stanovení duální fluorescence PKH barviv, kterými byly značeny jednak bakteriální buňky PA a plicní epiteliální buněčné linie (CuFi a NuLi). Značení fluorescenčními barviv s odlišnými excitačními a emisními vlnovými délkami umožňuje přesnou kvantifikaci adherovaných PA na konfluentní vrstvu epiteliálních buněk společně přítomných v jamce testovací destičky. Tímto testem se podařilo prokázat, že připravené protilátky IgY cílené proti bakteriálnímu lektinu PAIIL významně inhibují adhezi bakterií (až na 50 %) u obou plicních buněčných linií a jsou tedy účinné při redukci míry rozvoje infekce PA. V souladu s údaji o podmínkách v dýchacím traktu pacientů s CF byla též potvrzena vyšší citlivost na adhezi PA u CF buněčných linií (CuFi) ve srovnání s NuLi buňkami zdravého jedince. Toto zjištění potvrzuje spolehlivost vyvinutého adhezního testu i ve smyslu dobrého napodobení stavu respiračního traktu pacientů s CF.

Dále jsme s využitím adhezního testu prokázali, že specifické protilátky anti-PAIIL IgY od dvou různých slepic jsou srovnatelně účinné z hlediska jejich schopnosti neutralizovat vazbu PA na plicní epiteliální buňky. Slepici tedy lze považovat za vhodný a spolehlivý organismus pro jejich produkci. Důležitým zjištěním bylo, že

protilátky anti-PAIIL IgY chrání plicní buněčné linie proti adhezi různých kmenů *Pseudomonas aeruginosa*. Díky využití bioluminiscenčního kmene PA-Lux bylo možno zjednodušit experimentální uspořádání našeho adhezního testu, protože odpadá nutnost barvení buněk PA.

Po průkazu účinnosti anti-PAIIL IgY na buněčných liniích směřoval náš další výzkum k vývoji vhodného experimentálního *in vivo* modelu, který by napodoboval podmínky v plicích pacientů s CF a posloužil pro další studium CF. Podařilo se vyvinout myší model, založený na působení enzymu neuraminidasy na plicní epitel. Tento enzym odštěpuje terminální kyselinu sialovou z glykokonjugátů epiteliálních buněk, čímž vznikají asialogangliosidy působící jako receptory pro patogeny včetně PA. Vliv neuraminidasy byl nejprve studován na experimentálním systému plicních buněčných linií, kdy se podařilo ověřit náš předpoklad, že zvyšující se dávka enzymu vedla ke zvýšení bakteriální adheze PA k epiteliálním buňkám. Na základě zjištění, že působení enzymu zvyšuje citlivost buněk k infekci PA, byly provedeny experimenty *in vivo*. Naše výsledky naznačují, že dávka 100 U neuraminidasy, intratracheálně aplikované do respiračního traktu myší, významně zvyšuje jejich náchylnost k rozvoji zánětu vyvolaného infekcí PA-Lux (dávkou 5×10^5 CFU). Jelikož aplikace samotného enzymu do trachey myší nevyvolala žádné známky zánětu, které by byly pozorovatelné na řezech plic experimentálních zvířat, lze dedukovat, že zvýšená náchylnost myší na infekci PA je způsobena desialilací glykokonjugátů na povrchu epiteliálních buněk dýchacích cest.

Námi vyvinutý zvířecí model pro studium CF má na rozdíl od geneticky nemodifikovaných myší řadu výhod, např. myši netrpí střevními potížemi, tak jako je tomu u myších modelů CF, či navození infekce PA lze provést přirozeně bez podpůrných agarosových kuliček, které mohou ovlivnit a zkreslit reakci experimentálních zvířat. Náš model lze využít pro hledání dalších alternativních způsobů léčby cystické fibrosy, včetně testování profylaktického působení specifických IgY proti infekcím PA.

5. Použitá literatura

- Abbas, A. T.; El-Kafrawy, S. A.; Sohrab, S. S.; Azhar, E. I. A.: IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Human Vaccines Immunother.* 15:1, 264-75 (2019)
- Akita, E. M.; Nakai, S.: Production and purification of Fab' fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). *J. Immunol. Methods* 162:2, 155-64 (1993)
- Alhadeff, J. A.: Glycoproteins and cystic fibrosis: A review. *Clin. Genet.* 14:4, 189-201 (2008)
- Alves, M. G.; Sa, R.; Jesus, T. T.; Sousa, M.; Oliveira, P. F.: CFTR Regulation of Aquaporin-Mediated Water Transport: A Target in Male Fertility. *Curr. Drug Targets* 16:9, 993-1006 (2015)
- Armstrong, D. K.; Cunningham, S.; Davies, J. C.; Alton, E. W. F. W.: Gene therapy in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* 99:5, 465-8 (2014)
- Avichezer, D.; Katcoff, D. J.; Garber, N. C.; Gilboa-Garber, N.: Analysis of the amino acid sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* galactophilic PA-I lectin. *J. Biol. Chem.* 267:32, 23023-27 (1992)
- Banin, E.; Vasil, M. L.; Greenberg, E. P.: Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:31, 11076-81 (2005)
- Barasch J.; Kiss, B.; Prince, A.; Saiman, L.; Gruenert, D.; Al-Awqati, Q.: Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* 352:6330, 70-73 (1991)
- Barasch, J.; Al-Awqati, Q.: Defective acidification of the biosynthetic pathway in cystic fibrosis. *J. Cell Sci. Suppl.* 17, 229-33 (1993)
- Baxter, D.: Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occup. Med.-Oxf.* 57:8, 552-556 (2007)
- Berdiev, B. K.; Qadri, Y. J.; Benos, D. J.: Assessment of the CFTR and ENaC association. *Mol. Biosyst.* 5:2, 123-27 (2009)
- de Bentzmann, S.; Roger, P.; Dupuit, F.; Bajolet-Laudinat, O.; Fuchey, C.; Plotkowski, M. C.; Puchelle, E.: Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect. Immun.* 64:5, 1582-88 (1996)
- Bereli, N.; Akgöl, S.; Yavuz, H.; Denizli, A.: Antibody purification by concanavalin A affinity chromatography. *J. Appl. Polym. Sci.* 97:3, 1202-08 (2005)
- Blanchard, B.; Nurisso, A.; Hollville, E.; Tetaud, C.; Wiels, J.; Pokorna, M.; Wimmerova, M.; Varrot, A.; Imbert, A.: Structural Basis of the Preferential Binding for Globo-Series Glycosphingolipids Displayed by *Pseudomonas aeruginosa* Lectin I. *J. Mol. Biol.* 383:4, 837-53 (2008)
- Blohmke, C. J.; Mayer, M. L.; Tang, A. C.; Hirschfeld, A. F.; Fjell, C. D.; Sze, M. A.; Falsafi, R.; Wang, S.; Hsu, K.; Chilvers, M. A.; Hogg, J. C.; Hancock, R. E. W.; Turvey, S. E.: Atypical Activation of the Unfolded Protein Response in Cystic Fibrosis Airway Cells Contributes to p38 MAPK-Mediated Innate Immune Responses. *J. Immunol.* 189:11, 5467-75 (2012)
- de Boeck, K.: Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr.* 109:5, 893-99 (2020)
- de Boeck, K.; Amaral, M. D.: Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir. Med.* 4:8, 662-74 (2016)
- Borthwick, L. A.; Kerbirou, M.; Taylor, C. J.; Cozza, G.; Lasu, I.; Postel, E. H.; Cassidy, D.; Trouve, P.; Mehta, A.; Robson, L.; Muimo, R.: Role of Interaction and Nucleoside Diphosphate Kinase B in Regulation of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function by cAMP-Dependent Protein Kinase A. *PLoS One* 11:3, (2016)

- Bragonzi, A.: Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 300:8, 584-93 (2010)
- Breg, J.; Van Halbeek, H.; Vliegthart, J. F.; Lamblin, G.; Houvenaghel, M. C.; Roussel, P.: Structure of sialyl-oligosaccharides isolated from bronchial mucus glycoproteins of patients (blood group O) suffering from cystic fibrosis. *Eur. J. Biochem.* 168:1, 57-68 (1987)
- Brunetti-Pierri, N. a Ng, P.: Progress and prospects: gene therapy for genetic diseases with helper-dependent adenoviral vectors. *Gene Ther.* 15:8, 553-560 (2008)
- Button B.; Cai, L. H.; Ehre, C.; Kesimer, M.; Hill, D. B.; Sheehan, J. K.; Boucher, R. C.; Rubinstein, M.: A Periciliary Brush Promotes the Lung Health by Separating the Mucus Layer from Airway Epithelia. *Science* 337:6097, 937-41 (2012)
- Byrd, M. S.; Sadovskaya, I.; Vinogradov, E.; Lu, H.; Sprinkle, A. B.; Richardson, S. H.; Ma, L.; Ralston, B.; Parsek, M. R.; Anderson, E. M.; Lam, J. S.; Wozniak, D. J.: Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol. Microbiol.* 73:4, 622-38 (2009)
- Cacalano G.; Kays, M.; Saiman, L.; Prince, A.: Production of the *Pseudomonas aeruginosa* neuraminidase is increased under hyperosmolar conditions and is regulated by genes involved in alginate expression. *J. Clin. Invest.* 89:6, 1866-74 (1992)
- Carlander, D.; Kollberg, H.; Wejaker, P. E.; Larsson, A.: Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol. Res.* 21:1, 1-6 (2000)
- Carson, M. R.; Travis, S. M.; Welsh, M. J.: The two nucleotide-binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J. Biol. Chem.* 270:4, 1711-17 (1995)
- Cioci, G.; Mitchell, E. P.; Gautier, C.; Wimmerova, M.; Sudakevitz, D.; Perez, S.; Gilboa-Garber, N.; Imberty, A.: Structural basis of calcium and galactose recognition by the lectin PA-IL of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 555:2, 297-301 (2003)
- Cohen, T. S a Prince, A.: Cystic fibrosis: A mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat. Med.* 18:4, 509-19 (2012)
- Cohen-Cymbarknoh, M.; Kerem, E.; Ferkol, T.; Elizur, A.: Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications. *Thorax.* 68:12, 1157-62 (2013)
- Costa, K. C.; Bergkessel, M.; Saunders, S.; Korlach, J.; Newman, D. K.: Enzymatic Degradation of Phenazines Can Generate Energy and Protect Sensitive Organisms from Toxicity. *MBIO* 6:6, e01520-15 (2015)
- Csanády, L.; Vergani, P.; Gadsby, D. C.: Structure, Gating, and Regulation of the CFTR Anion Channel. *Physiol Rev.* 99:1, 707-38 (2019)
- Diggle, S. P.; Stacey, R. E.; Dodd, C.; Camara, M.; Williams, P.; Winzer, K.: The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 8:6, 1095-1104 (2006)
- Doering, G.; Meisner, C.; Stern, M.: A double-blind randomized placebo-controlled phase III study of a *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine in cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:26, 11020-25 (2007)
- Döring, G. a Pier, G. B.: Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* 26:8, 1011-24 (2008)
- Dosanjh, A.; Lencer, W.; Brown, D.; Ausiello, D. A.; Stow, J. L.: Heterologous expression of delta F508 CFTR results in decreased sialylation of membrane glycoconjugates. *Am. J. Physiol.* 266:2, C360-C366 (1994)

- Dosanjh, A.; Muchmore, E. A.: Expression of $\Delta F508$ Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) Decreases Membrane Sialylation. *Open Respir. Med. J.* 3, 79-84 (2009)
- Du, K.; Lukacs, G. L.: Cooperative Assembly and Misfolding of CFTR Domains in vivo. *Mol. Biol. Cell.* 20:7, 1903-15 (2009)
- Edlund, A.; Pedersen, M. G.; Lindqvist, A.; Wierup, N.; Flodstrom-Tullberg, M.; Eliasson, L.: CFTR is involved in the regulation of glucagon secretion in human and rodent alpha cells. *Sci. Rep.* 7, 90 (2017)
- Eschenhagen, P.; Grehn, C.; Schwarz, C.: Prospective Evaluation of *Aspergillus fumigatus*-Specific IgG in Patients with Cystic Fibrosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 602836 (2021)
- Fajac, I. a Wainwright, C. E.: New treatments targeting the basic defects in cystic fibrosis. *Presse Med.* 46:6 (Pt 2), e165-e175 (2017)
- Fila L.: Cystická fibróza u dospělých. *Interní Med.* 16:2, 54-60 (2014)
- Furukawa, S.; Kuchma, S. L.; O'Toole, G. A.: Keeping Their Options Open: Acute versus Persistent Infections. *J. Bacteriol.* 188:4, 1211-17 (2006)
- Garber, N.; Guempel, U.; Belz, A.; Gilboa-Garber, N.; Doyle, R. J.: On the specificity of the D-galactose-binding lectin (PA-I) of *Pseudomonas aeruginosa* and its strong binding to hydrophobic derivatives of D-galactose and thiogalactose. *Biochim Biophys Acta* 1116:3, 331-33 (1992)
- Gassmann, M.; Thommes, P.; Weiser, T.; Hubscher, U.: Efficient production of chicken egg-yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* 4:8, 2528-32 (1990)
- Gellatly, S. L.; Hancock, R. E. W.: *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.* 67:3, 159-173 (2013)
- Gentzsch, M. a Mall, M. A.: Ion Channel Modulators in Cystic Fibrosis. *Chest* 154:2, 383-93 (2018)
- Gilboa-Garber, N.: Ihibition of broad spectrum hemagglutinin from *Pseudomonas aeruginosa* by D-galactose and its derivatives. *FEBS Lett.* 20:2, 242-44 (1972)
- Gilboa-Garber, N.; Katcoff, D. J.; Garber, N. C.: Identification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PA-III lectin gene and protein compared to PA-IL. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29:1, 53-6 (2000)
- Gilboa-Garber, N.; Mizrahi, L.; Garber, N.: Mannose-binding hemagglutinins in extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Biochem.* 55:9, 975-81 (1977)
- Gilgunn, S.; Martin, S. M.; Wormald, M. R.; Zapatero-Rodriguez, J.; Conroy, P. J.; O'Kennedy, R. J.; Rudd, P. M.; Saldova, R.: Comprehensive N-Glycan Profiling of Avian Immunoglobulin Y. *PLoS One* 11:7, e0159859 (2016)
- Glick, J.; Garber, N.: The Intracellular-localization of *Pseudomonas aeruginosa* Lectins. *J. Gen. Microbiol.* 129, 3085-90 (1983)
- Glick, M. C.; Kothari, V. A.; Liu, A. H.; Stoykova, L. I.; Scanlin, T. F.: Activity of fucosyltransferases and altered glycosylation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochimie* 83:8, 743-47 (2001)
- Goetze, A. M.; Liu, Y. D.; Zhang, Z.; Shah, B.; Lee, E.; Bondarenko, P. V.; Flynn, G. C.: High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. *Glycobiology* 21:7, 949-59 (2011)
- Griesenbach, U.; Pytel, K. M.; Alton, E. W. F. W.: Cystic Fibrosis Gene Therapy in the UK and Elsewhere. *Hum. Gene Ther.* 26:5, 266-275 (2015)
- Grishin, A. V.; Krivozubov, M. S.; Karyagina, A. S.; Gintsburg, A. L.: *Pseudomonas Aeruginosa* Lectins as Targets for Novel Antibacterials. *Acta Naturae* 7:2, 29-41 (2015)

- Grünewald, S.; Matthijs, M.; Jaeken, J.: Congenital Disorders of Glycosylation: A Review. *Pediatr. Res.* 52:5, 618-24 (2002)
- Guilbault, C.; Saeed, Z.; Downey, G. P.; Radzioch, D.: Cystic Fibrosis Mouse Models. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 36:1, 1-7 (2007)
- Hall, S.; McDermott, C.; Anoopkumar-Dukie, S.; McFarland, A. J.; Forbes, A.; Perkins, A. V.; Davey, A. K.; Chess-Williams, R.; Kiefel, M. J.; Arora, D.; Grant, G. D.: Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8:8, 236 (2016)
- Harmsen, M.; Yang, L.; Pamp, S. J.; Tolker-Nielsen, T.: An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59:3, 253-68 (2010)
- Hassan, H.; Fridovich, I.: Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine. *J Bacteriol.* 141:1, 156-63 (1980)
- Hatrup, C. L.; Gendler, S. J.: Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 431-57 (2008)
- Hauber, H. P.; Schulz, M.; Pforte, A.; Mack, D.; Zabel, P.; Schumacher, U.: Inhalation with Fucose and Galactose for Treatment of *Pseudomonas Aeruginosa* in Cystic Fibrosis Patients. *Int. J. Med. Sci.* 5:6, 371-6 (2008)
- Hawdon, N. A.; Aval, P. S.; Barnes, R. J.; Gravelle, S. K.; Rosengren, J.; Khan, S.; Ciofu, O.; Johansen, H. K.; Hoiby, N.; Ulanova, M.: Cellular responses of A549 alveolar epithelial cells to serially collected *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients at different stages of pulmonary infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59:2, 207-20 (2010)
- Hilpert, K.; Hancock, R. E. W.: Use of luminescent bacteria for rapid screening and characterization of short cationic antimicrobial peptides synthesized on cellulose using peptide array technology. *Nat. Protoc.* 2:7, 1652-60 (2007)
- Hodek, P.; Trefil, P.; Simunek, J.; Hudecek, J.; Stiborova, M.: Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. *Int. J. Electrochem. Sci.* 8:1, 113-24 (2013)
- Hořejší, V.; Bartůňková, J.; Brdička, T.; Špíšek, R.: Základy imunologie 6., aktualizované vydání, Triton (2017)
- Hwang, T. C.; Sheppard, D. N.: Gating of the CFTR Cl⁻ channel by ATP-driven nucleotide-binding domain dimerisation. *J. Physiol.* 587:10, 2151-61 (2009)
- Chalghoumi, R.; Beckers, Y.; Portetelle, D.; Thewis, A.: Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. *Biotechnol. Agron. Soc.* 13:2, 295-308 (2009)
- Chemani, C.; Imberty, A.; de Bentzmann, S.; Pierre, M.; Wimmerova, M.; Guery, B. P.; Faure, K.: Role of LecA and LecB Lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Lung Injury and Effect of Carbohydrate Ligands. *Infect. Immun.* 77:5, 2065-75 (2009)
- Chen, C. P.; Song, S. C.; Gilboa-Garber, N.; Chang, K. S. S.; Wu, A. M.: Studies on the binding site of the galactose-specific agglutinin PA-IL from *Pseudomonas aeruginosa*. *Glycobiology* 8:1, 7-16 (1998)
- Ikemori, Y.; Peralta, R. C.; Kuroki, M.; Yokoyama, H.; Kodama, Y.: Research Note: Avidity of Chicken Yolk Antibodies to Enterotoxigenic *Escherichia coli* Fimbriae. *Poult. Sci.* 72:12, 2361-65 (1993)
- Imberty, A.; Wimmerova, M.; Mitchell, E. P.; Gilboa-Garber, N.: Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect.* 6:2, 221-28 (2004)

- Imundo, L.; Barasch, J.; Prince, A.; Al-Awqati, Q.: Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7, 3019-23 (1995)
- Jílková, E.: Principy aktivní imunizace. Je očkování zátěž? *Interní Med.* 14:8-9, 336-38 (2012)
- Jilling, T.; Kirk, K. L.: The biogenesis, traffic, and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Int. Rev. Cytol.* 172, 193-241 (1997)
- Jones, G. H.; Walshaw, M. J.: Potential impact on fertility of new systemic therapies for cystic fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* 16:SI, 25-27 (2015)
- Kadam, R. U.; Bergmann, M.; Hurley, M.; Garg, D.; Cacciarini, M.; Swiderska, M. A.; Nativi, C.; Sattler, M.; Smyth, A. R.; Williams, P.; Camara, M.; Stocker, A.; Darbre, T.; Reymond, J. L.: A Glycopeptide Dendrimer Inhibitor of the Galactose-Specific Lectin LecA and of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50:45, 10631-35 (2011)
- Keiser, N. W.; Engelhardt, J. F.: New animal models of cystic fibrosis: what are they teaching us? *Curr. Opin. Pulm. Med.* 17:6, 478-83 (2011)
- Kim, H. O.; Kim, H. S.; Youn, J. C.; Shin, E. C.; Park, S.: Serum cytokine profiles in healthy young and elderly population assessed using multiplexed bead-based immunoassays. *J. Transl. Med.* 9, 113 (2011)
- Klockgether, J.; Cramer, N.; Wiehlmann, L.; Davenport, C. F.; Tümmeler, B.: *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front Micro-biol.* 2, 150, (2011)
- Kovacs-Nolan, J.; Mine, Y.: Egg Yolk Antibodies for Passive Immunity. *Annu. Rev. Food Sci.* 3, 163-82 (2012)
- Kucharska, I.; Liang, B. Y.; Ursini, N.; Tamm, L. K.: Molecular Interactions of Lipopolysaccharide with an Outer Membrane Protein from *Pseudomonas aeruginosa* Probed by Solution NMR. *Biochemistry* 55:36, 5061-72 (2016)
- Kukavica-Ibrulj, I.; Levesque, R. C.: Animal models of chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*: useful tools for cystic fibrosis studies. *Lab. Anim.* 42:4, 389-412 (2008)
- Leubitz, A.; Frydman-Maron, A.; Sharpe, N.; van Duzer, J.; Campbell, K. C. M.; Vanhoutte, F.: Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Single Ascending Doses of ELX-02, a Potential Treatment for Genetic Disorders Caused by Nonsense Mutations, in Healthy Volunteers. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* 8:8, 984-94 (2019)
- Li, X.; Wang, L.; Zhen, Y.; Li, S.; Xu, Y.: Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in swine production: a review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6, 40 (2015)
- Liu L.: Antibody Glycosylation and Its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins. *J. Pharm. Sci.* 104:6, 1866-84 (2015)
- Loris, R.; Tielker, D.; Jaeger, K. E.; Wyns, L.: Structural basis of carbohydrate recognition by the lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 331:4, 861-70 (2003)
- Malhotra, S.; Don Hayes, D. Jr.; Wozniak, D. J.: Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. *Clin. Microbiol. Rev.* 32:3, e0138-18 (2019)
- Martini, S. V.; Rocco, P. R. M.; Morales, M. M.: Adeno-associated virus for cystic fibrosis gene therapy. *Braz. J Med. Biol. Res.* 44:11, 1097-104 (2011)
- Martino, A. T.; Mueller, C.; Braag, S.; Cruz, P. E.; Campbell-Thompson, M.; Jin, S.; Flotte, T. R.: N-glycosylation augmentation of the cystic fibrosis epithelium improves

- Pseudomonas aeruginosa* clearance. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44:6, 824-30 (2011)
- Matrosovich, M. N.; Matrosovich, T. Y.; Gray, T.; Roberts, N. A.; Klenk, H. D.: Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:13, 4620-24 (2004)
- Matthews L. W.; Spector, S.; Lemm, J.; Potter, J. L.: Studies on pulmonary secretions. i. the over-all chemical composition of pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis, and laryngectomy. *Am. Rev. Respir. Dis.* 88, 199-204 (1963)
- Maule, G.; Casini, A.; Montagna, C.; Ramalho, A. S.; De Boeck, K.; Debyser, Z.; Carlon, M. S.; Petris, G.; Cereseto, A.: Allele specific repair of splicing mutations in cystic fibrosis through AsCas12a genome editing. *Nat. Commun.* 10, 3556 (2019)
- McGuckin, M. A.; Linden, S. K.; Sutton, P.; Florin, T. H.: Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 9:4, 265-78 (2011)
- McMorran, B. J.; Palmer, J. S.; Lunn, D. P.; Oceandy, D.; Costelloe, E. O.; Thomas, G. R.; Hume, D. A.; Wainwright, B. J.: G551D CF mice display an abnormal host response and have impaired clearance of *Pseudomonas* lung disease. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 281:3, L740-47 (2001)
- Meng, X.; Clews, J.; Kargas, V.; Wang, X.; Ford, R.C.: The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and its stability. *Cell. Mol. Life Sci.* 74:1, 23-38 (2017)
- Merakou, C.; Schaefer, M. M.; Priebe, G. P.: Progress Toward the Elusive *Pseudomonas aeruginosa* Vaccine. *Surg. Infect.* 19:8, 757-68 (2018)
- Mewe, M.; Tielker, D.; Schonberg, R.; Schachner, M.; Jaeger, K. E.; Schumacher, U.: *Pseudomonas aeruginosa* lectins I and II and their interaction with human airway cilia. *J. Laryngol. Otol.* 119:8, 595-99 (2005)
- Mitchell, E.; Houles, C.; Sudakevitz, D.; Wimmerova, M.; Gautier, C.; Perez, S.; Wu, A. M.; Gilboa-Garber, N.; Imberty, A.: Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. *Nat. Struct. Biol.* 9:12, 918-21 (2002)
- Moradali, M. F.; Ghods, S.; Rehm, B. H. A.: *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 39 (2017)
- Morlon-Guyot, J.; Mere, J.; Bonhoure, A.; Beaumelle, B.: Processing of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A is Dispensable for Cell Intoxication. *Infect. Immun.* 77:7, 3090-99 (2009)
- Murray, P. R.; Rosenthal, K.; Pfaller, M.: Medical Microbiology Eighth Edition. Elsevier, Philadelphia, ISBN: 978-0-323-29956-5 (2016)
(dostupné z: <https://iums.ac.ir/files/microb/files/Murray.pdf>)
- Narat M.: Production of Antibodies in Chickens. *Food Technol. Biotechnol.* 41:3, 259-67 (2003)
- Nilsson, E.; Larsson, A.; Olesen, H. V.; Wejlker, P. E.; Kollberg, H.: Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* 43:9, 892-99 (2008)
- Noskova, L.; Kubickova, B.; Vaskova, L.; Blahova, B.; Wimmerova, M.; Stiborova, M.; Hodek, P.: Fluorescent Cellular Assay for Screening Agents Inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* Adherence. *Sensors* 15:1, 1945-53 (2015)
- Nurisso, A.; Blanchard, B.; Audfray, A.; Rydner, L.; Oscarson, S.; Varrot, A.; Imberty, A.: Role of Water Molecules in Structure and Energetics of *Pseudomonas aeruginosa* Lectin I Interacting with Disaccharides. *J. Biol. Chem.* 285:26, 20316-27 (2010)

- O’Riordan, C. R.; Lachapelle, A. L.; Marshall, J.; Higgins, E. A.; Cheng, S. H.: Characterization of the oligosaccharide structures associated with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Glycobiology* 10:11, 1225-33 (2000)
- osobní sdělení: vyjádření tiskového oddělení SÚKL ze dne 30. 3. 2021 (emailová komunikace)
- osobní sdělení prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. (Univerzita Karlova v Praze) 2014
- Ostedgaard, L. S.; Meyerholz, D. K.; Chen, J. H.; Pezzulo, A. A.; Karp, P. H.; Rokhlina, T.; Ernst, S.; Hanfland, R. A.; Reznikov, L. R.; Ludwig, P.; Rogan, M.; Davis, G. J.; Dohrn, C.; Wohlford-Lenane, C.; Taft, P. J.; Rector, M. V.; Hornick, E. E.; Nassar, B.; Samuel, M.; Zhang, Y.; Richter, S.; Uç, A.; Shilyansky, J.; Prather, R.; McCray, P.; Zabner, J.; Welsh, M.; Stoltz, D.: The $\Delta F508$ Mutation Causes CFTR Misprocessing and Cystic Fibrosis–Like Disease in Pigs. *Sci. Transl. Med.* 3:74, 74ra24 (2011)
- Parad, R. B.; Gerard, C. J.; Zurakowski, D.; Nichols, D. P.; Pier, G. B.: Pulmonary outcome in cystic fibrosis is influenced primarily by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and immune status and only modestly by genotype. *Infect. Immun.* 67:9, 4744-50 (1999)
- Parekh, R. B.; Dwek, R. A.; Sutton, B. J.; Fernandes, D. L.; Leung, A.; Stanworth, D.; Rademacher, T. W.; Mizuochi, T.; Taniguchi, T.; Matsuta, K.; Takeuchi, F.; Nagano, Y.; Miyamoto, T.; Kobata, A.: Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature*, 316:6027, 452-57 (1985)
- Pier G. B.: Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:16, 8822-28 (2000)
- Pier, G. B.; Grout, M.; Zaidi, T. S.: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:22, 12088-93 (1997)
- Powell, L. C.; Pritchard, M. F.; Ferguson, E. L.; Powell, K. A.; Patel, S. U.; Rye, P. D.; Sakellakou, S. M.; Buurma, N. J.; Brilliant, C. D.; Copping, J. M.; Menzies, G. E.; Lewis, P. D.; Hill, K. E.; Thomas, D. W.: Targeted disruption of the extracellular polymeric network of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by alginate oligosaccharides. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 4, 13 (2018)
- Priebe, G. B.; Goldberg, J. B.: Vaccines for *Pseudomonas aeruginosa*: a long and winding road. *Expert Rev. Vaccines* 13:4, 507-519 (2014)
- Rahman, S.; Higo-Moriguchi, K.; Htun, K. W.; Taniguchi, K.; Icatlo, F. C. Jr.; Tsuji, T.; Kodama, Y.; Van Nguyen, S.; Umeda, K.; Oo, H. N.; Myint, Y. Y.; Htut, T.; Myint, S. S.; Thura, K.; Thu, H. M.; Fatmawati, N. N.; Oguma, K.: Randomized placebo-controlled clinical trial of immunoglobulin Y as adjunct to standard supportive therapy for rotavirus-associated diarrhea among pediatric patients. *Vaccine* 30:31, 4661-69 (2012)
- Rasamiravaka, T.; Labtani, Q.; Duez, P.; El Jaziri, M.: The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *Biomed Res Int.* 2015, 759348 (2015)
- Riordan, J. R.; Rommens, J. M.; Kerem, B.; Alon, N.; Rozmahel, R.; Grzelczak, Z.; Zielenski, J.; Lok, S.; Plavsic, N.; Chou, J. L.: Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science* 245:4922, 1066-72 (1989)
- Rock, J. R.; O’Neal, W. K.; Gabriel, S. E.; Randell, S. H.; Harfe, B. D.; Boucher, R. C.; Grubb, B. R.: Transmembrane Protein 16A (TMEM16A) Is a Ca^{2+} -regulated Cl^- Secretory Channel in Mouse Airways. *J. Biol. Chem.* 284:22, 14875-80 (2009)

- Sabin, C.; Mitchell, E. P.; Pokorna, M.; Gautier, C.; Utile, J.P.; Wimmerova, M.; Imberty, A.: Binding of different monosaccharides by lectin PA-III from *Pseudomonas aeruginosa*: Thermodynamics data correlated with X-ray structures. *FEBS Lett.* 580:3, 982-87 (2006)
- Saiman, L. a Prince, A.: *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 92:4, 1875-80 (1993)
- Sarnesto, A.; Ranta, S.; Seppalla, I. J. T.; Makela, O.: Relative immunogenicity in mice of different regions of the human IgG. *Scand. J. Immunol.* 17:6, 507-11 (1983)
- Scanlin, T. F.; Glick, M. C.: Terminal glycosylation in cystic fibrosis. *Biochem. Biophys. Act.* 1445, 241-53 (1999)
- Semaniakou, A.; Croll, R. P.; Chappe, V.: Animal models in the pathophysiology of cystic fibrosis. *Front. Pharmacol.* 9:1475 (2019)
- Sheppard, D. N.; Welsh, M. J.: Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* 79:1 Suppl., S23-45 (1999)
- Schade, K.; Calzado, E. G.; Sarmiento, R.; Chacana, P. A.; Porankiewicz-Asplund, J.; Terzolo, H. R.: Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern. Lab. Anim.* 33:2, 129-54 (2005)
- Scharfman, A.; Degroote, S.; Beau, J.; Lamblin, G.; Roussel, P.; Mazurier, J.: *Pseudomonas aeruginosa* binds to neoglycoconjugates bearing mucin carbohydrate determinants and predominantly to sialyl-Lewis x conjugates. *Glycobiology* 9:8, 757-64 (1999)
- Scharfman, A.; VanBrussel, E.; Houdret, N.; Lamblin, G.; Roussel, P.: Interactions between glycoconjugates from human respiratory airways and *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154:4, S163-69 (1996)
- Schobert, M.; Jahn, D.: Anaerobic physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol.* 300:8, 549-56 (2010).
- Scholte, B. J.; Davidson, D. J.; Wilke, M.; De Jonge, H. R.: Animal models of cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 3:2, 183-90 (2004)
- Schuster, A.; Bend, J.; Hoiby, N.; Verde, P. E.; Rottmann, A.; Larsson, A.: Clinical study to evaluate an anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgY gargling solution (EUDRACT 2011-000801-39). *J. Cyst. Fibros.* 18:1, S23 (2019)
- da Silva, W. D.; Tambourgi, D. V.: IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135:3-4, 173-80 (2010)
- Skalická V.: Terapeutické trendy cystické fibrózy. *Pediatr. Praxi*, 15:6, 340-43 (2014)
- Smith A.: Pathogenesis of bacterial bronchitis in cystic fibrosis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16:1, 91-96 (1997)
- Soong, G.; Muir, A.; Gomez, M. I.; Waks, J.; Reddy, B.; Planet, P.; Singh, P. K.; Kaneko, Y.; Wolfgang, M. C.; Hsiao, Y. S.; Tong, L.; Prince, A.: Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production. *J. Clin. Invest.* 116:8, 2297-2305 (2006)
- Stutts, M. J.; Canessa, C. M.; Olsen, J. C.; Hamrick, M.; Cohn, J. A.; Rossier, B. C.; Boucher, R. C.: CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269:5225, 847-50 (1995)
- Suzuki, N.; Lee, Y. C.: Site-specific N-glycosylation of chicken serum IgG. *Glycobiology* 14:3, 275-92 (2004)
- Štern, P.: Struktura protilátek a jejich reaktivita. *Klin. Biochem. Metab.* 24:45, 4-9 (2016)

- Tabor, D. E.; Oganessian, V.; Keller, A. E.; Yu, L.; McLaughlin, R. E.; Song, E.; Warren, P.; Rosenthal, K.; Esser, M.; Qi, Y.; Ruzin, A.; Stover, C. K.; DiGiandomenico, A.: *Pseudomonas aeruginosa* PcrV and Psl, the Molecular Targets of Bispecific Antibody MEDI3902, are Conserved Among Diverse Global Clinical Isolates. *J. Infect. Dis.* 218:12, 1983-94 (2018)
- Thomsen, K.; Christophersen, L.; Bjarnsholt, T.; Jensen, P. O.; Moser, C.; Hoiby, N.: Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgY Antibodies Induce Specific Bacterial Aggregation and Internalization in Human Polymorphonuclear Neutrophils. *Infect. Immun.* 83:7, 2686-93 (2015).
- Tizard, I.: The Avian Antibody Response. *Semin. Avian Exot. Pet Med.* 11:1, 2-14 (2002)
- Tsubokura, K.; Berndtson, E.; Bogstedt, A.; Kaijser, B.; Kim, M.; Ozeki, M.; Hammarstrom, L.: Oral administration of antibodies as prophylaxis and therapy in *Campylobacter jejuni*-infected chickens. *Clin. Exp. Immunol.* 108:3, 451-55 (1997)
- Vallieres, E.; Elborn, J. S.: Cystic fibrosis gene mutations: evaluation and assessment of disease severity. *Adv. Genom. Genet.* 4, 161-72 (2014)
- Van Den Steen, P.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Opdenakker, G.: Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33:3, 151-208 (1998)
- Van Heeckeren, A. M.; Schluchter, M. D.: Murine models of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Lab. Anim.* 36:3, 291-312 (2002)
- Vankeerberghen, A.; Cuppens, H.; Cassiman, J.-J.: The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J. Cyst. Fibros.* 1:1, 13-29 (2002)
- Vávrová, V.: Cystická fibróza v praxi, Kreace s.r.o., Praha (1999)
- Vávrová, V.: Cystická fibróza. Grada Publishing a. s., Praha, (2006)
- Vávrová, V.; Bartošová, J.; Fila, L.: Možnosti léčby cystické fibrózy – 1. část. *Klin. Farmakol. Farm.* 21:1, 22-26 (2007)
- Venkatakrishnan, V.; Packer, N. H.; Thaysen-Andersen, M.: Host mucin glycosylation plays a role in bacterial adhesion in lungs of individuals with cystic fibrosis. *Expert Rev. Respir. Med.* 7:5, 553-76 (2013)
- Virella-Lowell, I.; Herlihy, J. D.; Liu, B. Lopez, C.; Cruz, P.; Muller, C.; Baker, H. V.; Flotte, T. R.: Effects of CFTR, interleukin-10, and *Pseudomonas aeruginosa* on gene expression profiles in a CF bronchial epithelial cell line. *Mol. Ther.* 10:3, 562-73 (2004)
- Voet, D.; Voet, J. G.: Biochemistry. 3th ed. New York, John Wiley & Sons, (2006)
- Voynow, J. A.; Rubin, B. K.: Mucins, mucus, and sputum. *Chest.* 135:2, 505-12 (2009)
- Warr, G. W.; Magor, K. E.; Higgins, D. A.: IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today* 16:8, 392-8 (1995)
- Watt, A. P.; Courtney, J.; Moore, J.; Ennis, M.; Elborn, J. S.: Neutrophil cell death, activation and bacterial infection in cystic fibrosis. *Thorax.* 60:8, 659-64 (2005)
- Wei, L.; Vankeerberghen, A.; Cuppens, H.; Eggermont, J.; Cassiman, J. J.; Droogmans, G.; Nilius, B.: Interaction between calcium-activated chloride channels and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflugers. Arch.* 438:5, 635-41 (1999)
- Welsh, M. J.; Smith A. E.: Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73:7, 1251-54 (1993)
- Welsh, M. J.; Rogers, C. S.; Stoltz, D. A.; Meyerholz, D. K.; Prather, R. S.: Development of a porcine model of cystic fibrosis. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 120, 149-62 (2009)
- Wentworth, J. S.; Austin, F. E.; Garber, N.; Gilboa-Garber, N.; Paterson, C. A.; Doyle, R. J.: Cytoplasmic lectins contribute to the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling* 4:1-3, 99-104 (1991)

- Whiteley, M.; Diggle, S. P.; Greenberg, E. P.: Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* 551:7680, 313-320 (2017)
- Wine, J. J.: The development of lung disease in cystic fibrosis pigs. *Sci. Transl. Med.* 2:29, 29ps20 (2010)
- Wolska, K.; Zabielska, K.; Jakubczak, A.: Effect of neuraminidase on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells. Inhibition of adhesion by monosaccharides. *Pol. J. Microbiol.* 55:1, 43-8 (2006)
- Xu, Y.; Li, X.; Jin, L.; Zhen, Y.; Lu, Y.; Li, S.; You, J.; Wang, L.: Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. *Biotechnol. Adv.* 29:6, 860-68 (2011)
- Zhang, X. Y.; Calvert, R. A.; Sutton, B. J.; Dore, K. A.: IgY: a key isotype in antibody evolution. *Biol. Rev.* 92:4, 2144-56 (2017)
- Zielenski, J.: Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. *Respiration* 67,117-33 (2000)
- webový zdroj č. 1: „Johns Hopkins Cystic Fibrosis Center: CFTR - Effects on Other Channels“: dostupné z URL: <https://hopkinscf.org/knowledge/cftr/#section6> [cit. 10. 1. 2021]
- webový zdroj č. 2: „Cystic Fibrosis Mutation Database: Statistics“: dostupné z URL: <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html> [cit. 25. 11. 2020]
- webový zdroj č. 3: dostupné z URL: <https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:IMUNOGLOBULIN.png#filehistory> [cit. 20.4.2021]